

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM GENÓTIPOS DE PALMA FORRAGEIRA  
À INFESTAÇÃO POR *Dactylopius opuntiae* ASSOCIADOS AO PERFIL  
METABÓLICO**

**JANIEIRE DORLAMIS CORDEIRO BEZERRA**

**AREIA-PB  
FEVEREIRO-2018**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM GENÓTIPOS DE PALMA FORRAGEIRA  
À INFESTAÇÃO POR *Dactylopius opuntiae* ASSOCIADOS AO PERFIL  
METABÓLICO**

**JANIEIRE DORLAMIS CORDEIRO BEZERRA**

**Zootecnista**

**AREIA-PB  
FEVEREIRO-2018**

**JANIEIRE DORLAMIS CORDEIRO BEZERRA**

**MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM GENÓTIPOS DE PALMA FORRAGEIRA  
À INFESTAÇÃO POR *Dactylopius opuntiae* ASSOCIADOS AO PERFIL  
METABÓLICO**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado  
Integrado em Zootecnia da Universidade Federal da  
Paraíba, Universidade Federal Rural de Pernambuco  
e Universidade Federal do Ceará como requisito para  
obtenção do título de Doutora em Zootecnia.

Área de concentração: Forragicultura

**Comitê de Orientação:**

Prof. Dr. Albericio Pereira de Andrade – Orientador

Prof. Dr. Divan Soares da Silva – Co-orientador

Prof. Dr. Mailson Monteiro do Rego – Co-orientador

**AREIA-PB  
FEVEREIRO-2018**

Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da Biblioteca  
Setorial do CCA, UFPB, campus II, Areia – PB.

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

B574m Bezerra, Janieire Dorlamis Cordeiro.

MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM GENÓTIPOS DE PALMA  
FORRAGEIRA À INFESTAÇÃO POR *Dactylopius opuntiae*  
ASSOCIADOS AO PERFIL METABÓLICO / Janieire Dorlamis  
Cordeiro Bezerra. – Areia, 2018.  
150 f. : il.

Orientação: Albericio Pereira de Andrade.

Coorientação: Divan Soares da Silva, Mailson Monteiro  
do Rego.

Tese (Doutorado) – UFPB/CCA.

1. Zootecnia-Forragicultura. 2. Interação  
inseto-planta. 3. Resistência. 4. Inseto fitófago. 5.  
Melhoramento genético. I. Andrade, Albericio Pereira  
de. II. Silva, Divan Soares da. III. Rego, Mailson  
Monteiro do. IV. Título.

UFPB/CCA-AREIA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

PARECER DE DEFESA DO TRABALHO DE TESE

**TÍTULO:** “ Mecanismos de Resistência em Genótipos de Palma Forrageira à infestação por *Dactylopius Opuntiae* associados ao Perfil Metabólico”

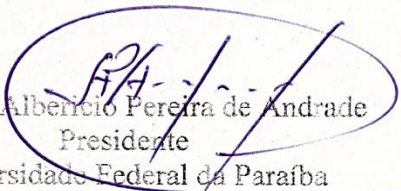
**AUTOR:** Janieire Dorlamis Cordeiro Bezerra


**ORIENTADOR:** Prof. Dr. Albericio Pereira de Andrade

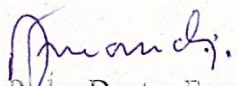
JULGAMENTO

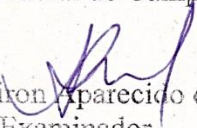
**CONCEITO:** APROVADO

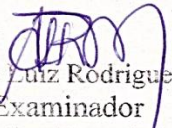
**EXAMINADORES:**

  
Prof. Dr. Albericio Pereira de Andrade  
Presidente  
Universidade Federal da Paraíba

  
Prof. Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza  
Examinadora  
Universidade Federal da Paraíba

  
Prof. Dr. Pedro Dantas Fernandes  
Examinador  
Universidade Federal de Campina Grande

  
Prof. Dr. Ailton Aparecido de Melo  
Examinador  
Universidade Federal Rural do Pernambuco

  
Prof. Dr. André Luiz Rodrigues Magalhães  
Examinador  
Universidade Federal Rural do Pernambuco

Areia, 26 de fevereiro de 2018

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

JANIEIRE DORLAMIS CORDEIRO BEZERRA-filha de Edenildo Cordeiro Leonardo e Marinalda Barros Bezerra Leonardo, nasceu em Garanhuns - PE no dia 29 de maio de 1987. Ingressou no curso de Zootecnia na turma 2006.2, na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG), obtendo o título de Bacharel em Zootecnia no dia 26 de agosto de 2011. Durante a graduação foi bolsista de extensão nos anos de 2009 a 2010 em dois projetos ligados a qualidade do leite e de seus derivados. Foi monitora das disciplinas de Plantas Forrageiras e Pastagens I e II e de Agrostologia e bolsista de iniciação científica (PIBIC) na área de Forragicultura entre os anos de 2010 e 2011. Em agosto de 2011, ingressou no Programa de Mestrado em Ciência Animal e Pastagens pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns-UFRPE/UAG, conduzindo o estudo de “Competição de variedades de cana-de-açúcar para forragem no Agreste de Pernambuco”, tendo defendido a dissertação em fevereiro de 2014. Em março de 2014, iniciou suas atividades no Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, na Universidade Federal da Paraíba (UFPB), na linha de pesquisa em Forragicultura sob a orientação do Professor Doutor Albericio Pereira de Andrade.

*Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;  
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. Nem  
mesmo a Lei de Murphy me impediu de sonhar.*

*A resiliência nos capacita a reinventar nas  
situações de crise e a Fé em Deus a seguir o nosso  
caminho.*

*A Deus*  
*Aos meus pais, Edenildo Cordeiro e Marinalda Barros*  
*Ao meu companheiro de profissão e vida, Ribamar Jr.*  
*Aos que torcem e vibram por minhas conquistas*

**DEDICO**



## AGRADECIMENTOS

A Deus, que nas horas mais difíceis nunca me deixou sozinha, sempre me orientando e protegendo.

Aos meus pais, Edenildo e Marinalda, por toda a força e apoio dado durante a minha vida, pelos princípios de educação e respeito, ensinando a ter fé e paciência, a nunca desistir.

Ao meu esposo Ribamar Jr. pelas ajudas durante a nossa jornada no PDIZ/UFPB, na condução do experimento, nas análises de laboratório, na paciência e compreensão, sinceridade e no companheirismo.

Ao meu orientador, Albericio Pereira, pela oportunidade de ter sido sua orientanda, pela amizade e orientações na construção desta tese, pelos conselhos dados para a minha formação, pelos desafios que me enriqueceram.

Aos pesquisadores do IPA Djalma Cordeiro e Francisco Abel, pelo apoio ao projeto e conselhos, além do fornecimento dos cladódios para a condução do experimento.

Aos meus co-orientadores Divan Soares e Mailson Monteiro, pelas orientações durante todas as etapas desta Tese, pelos conselhos e pelo enriquecimento acadêmico na minha formação. Ao Professor Mailson, juntamente com a professora Elizanilda, agradeço por conceder o espaço no Laboratório de Biologia Molecular para a realização das análises de genética.

À coordenação do PDIZ/UFPB (Professores Fernando Perazzo, Edson Mauro e Patrícia Givisiez) pela oportunidade de ter cursado o doutorado, pelas orientações nos entendimentos burocráticos e aos professores Edilson Saraiva, Edson Mauro, Gonzaga Neto, Gherman Leal, Walter Esfrain, Divan Soares, Albericio Pereira, Aline Mendes, Fátima Vanderlei e Yanna Teles por terem sido meus professores, aprendi muito com os senhores. À professora Riselane Lucena por conceder a estufa de vegetação para a realização das análises genéticas, pela amizade e conselhos e pela sua alegria, ao Professor Ariosvaldo de Medeiros, que sempre esteve à disposição a qualquer necessidade que eu tivesse, sanando as minhas dúvidas e ao professor Ivandro de França pelas orientações agronômicas.

A UFRPE/UAG, no qual foi desenvolvida parte do experimento, principalmente aos professores Airon Melo, André Magalhães e Ana Lúcia. Aos meus amigos e companheiros de trabalho, Jailson Costa, Livia Maria, Diana Valadares, Gaby Duarte, Sánara França, Élisson Macêdo e Luciana Costa, sem os quais teria sido muito difícil à condução do experimento. Aos funcionários da UAG, Cláudio, Jair, João Sales, Álvaro, Amadeu, Valdeline, Alcione, Edvânia, Silvio, André, Fábio e demais funcionários.

Aos professores da UFPB/João Pessoa, Fátima Vanderlei, Josean Fechine, Marcelo Sobral e Fátima Agra, por cederem seus laboratórios para a realização das análises dos metabólitos secundários e histoquímica. Ao professor Carlos Henrique pelo material de apoio. Aos professores do Estágio Docência, professora Aline Mendes e Glessner Barreto, pelo aprendizado nas aulas ministradas e assistidas e pelas orientações.

Aos amigos e colegas do doutorado (Wellington, Ângela, Glaucia, Danilo, Aline, Tonhá, Aianne, Natália Livia, Messias, Eriane, Samira, Fátima, Gildenia, Karialane, Cristine e Marcelo), sobretudo a minha turma 2014.1 (Alexandre, Cristina, Flavio Gomes, Flavio Soares, Talma, Priscila, Juliete, Candice, Ana Paula, Ana Jaqueline, Beatriz e Veruska), e ao Grupo Lavoura Xerófila (Adeilson, Táfnes, Leandro, Géssica, Italvan, Ribamar, Dinnara, Suelane, Marilania, Múcio, Danilo, Dudu, Natalia, Kleitiane, Kaio, Karla, Hactus, Francinilda, Rafael e Vanderleia) pela parceria, ajuda, amizade e os bons momentos.

Ao Leandro Pereira, Prof. Walter Esfrain e Ribamar Jr. pelo apoio estatístico e ao Professor Marcus Scott pelo suporte nas análises quimiométricas.

A Suelane Dias, Juliete Lima, Géssica Solanna, Italvan Milfont, Adeilson Melo, Karla Priscila, Leandro Pereira, Ana Lúcia, Janderson, Prof. Mauro Wagner, Janete Moura e Daurivane Rodrigues pela ajuda nas correções das minhas atividades de qualificação.

Aos professores membros da banca de qualificação e de defesa, pela disposição em contribuir para o aperfeiçoamento deste trabalho e aos funcionários da UFPB, em especial seu Nonato, a D. Graça, D. Carmen e Mayara pela atenção e apoio.

À CAPES e ao CNPq, pelo fomento e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização dessa etapa da minha vida.

**MUITO OBRIGADA!!**

## SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
RESUMO GERAL.....	xvi
GENERAL ABSTRACT.....	xviii
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
 CAPÍTULO I – Referencial Teórico - Mecanismos e causas da resistência de plantas a insetos e sua influência no valor nutricional: inferências na interação palma forrageira-cochonilha do carmim.....	 3
RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
1.1-INTRODUÇÃO.....	6
1.2-USO DA PALMA COMO FORRAGEIRA ( <i>Opuntia</i> e <i>Nopalea</i> ) E A INFESTAÇÃO COM <i>D. opuntiae</i> .....	7
1.3-TIPOS DE RESISTÊNCIA DE PLANTAS A INSETOS.....	9
1.4-MECANISMO DE DEFESA DOS INSETOS E MECANISMOS DE AÇÃO NA INTERAÇÃO INSETO-PLANTA.....	11
1.5-MECANISMO DE RESISTÊNCIA DE PALMA FORRAGEIRA AO <i>D. opuntiae</i> : ALGUMAS INFERÊNCIAS.....	13
1.6-INFLUÊNCIA DA RELAÇÃO INSETO-PLANTA NO VALOR NUTRICIONAL.....	19
1.7-CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	22
1.8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
 CAPÍTULO II - Valor nutricional de genótipos de palma forrageira ( <i>Opuntia</i> e <i>Nopalea</i> ) infestados com <i>Dactylopius opuntiae</i> .....	 28
RESUMO.....	29
ABSTRACT.....	30
2.1-INTRODUÇÃO.....	32
2.2-MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.2.1- Local do experimento e material genético.....	34
2.2.2 - Tratamentos e implantação do estudo.....	34
2.2.3 - Infestação e Dispersão do <i>Dactylopius opuntiae</i> .....	37
2.2.4 - Composição química-bromatológica dos genótipos de palma forrageira infestados com <i>Dactylopius opuntiae</i> .....	37
2.2.5 - Digestibilidade e degradabilidade dos genótipos de palma forrageira infestados com <i>Dactylopius opuntiae</i> .....	38
2.2.6 - Produção de gases dos genótipos de palma forrageira infestados com <i>Dactylopius opuntiae</i> .....	38
2.2.7 – Análise estatística.....	39
2.3-RESULTADOS.....	40

2.3.1 - Infestação e Dispersão do <i>Dactylopius opuntiae</i> .....	40
2.3.2 - Composição química-bromatológica dos genótipos de palma forrageira infestados com <i>Dactylopius opuntiae</i> .....	41
2.3.3 - Digestibilidade e degradabilidade dos genótipos de palma forrageira infestados com <i>Dactylopius opuntiae</i> .....	48
2.3.4 - Produção de gases dos genótipos de palma forrageira infestados com <i>Dactylopius opuntiae</i> .....	50
2.4-DISCUSSÃO.....	55
2.5-CONCLUSÕES.....	63
2.6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
 CAPÍTULO III - Metabólitos secundários de genótipos palma forrageira ( <i>Opuntia</i> e <i>Nopalea</i> ) infestados com <i>Dactylopius opuntiae</i> .....	69
RESUMO.....	70
ABSTRACT.....	71
3.1-INTRODUÇÃO.....	72
3.2-MATERIAL E MÉTODOS.....	74
3.2.1 - Local do experimento e material genético.....	74
3.2.2 – Tratamentos e implantação do estudo.....	75
3.2.3 – Prospeção fitoquímica.....	78
3.2.4 – Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de <sup>1</sup> H.....	78
3.2.5 – Análise estatística.....	79
3.3-RESULTADOS.....	79
3.3.1 – Prospeção fitoquímica.....	79
3.3.2– Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de <sup>1</sup> H.....	83
3.4-DISCUSSÃO.....	86
3.5-CONCLUSÕES.....	91
3.6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
 CAPÍTULO IV - Diversidade genética por RAPD, ITS e ISSR de genótipos de palma forrageira ( <i>Opuntia</i> e <i>Nopalea</i> ) com diferentes graus de resistência ao inseto <i>Dactylopius opuntiae</i> .....	96
RESUMO.....	97
ABSTRACT.....	98
4.1-INTRODUÇÃO.....	99
4.2-MATERIAL E MÉTODOS.....	101
4.2.1- Local do experimento e material genético.....	101
4.2.2 - Análise de ITS-PCR.....	103
4.2.3 - Análise de RAPD-PCR.....	104
4.2.4 - Análise ISSR-PCR.....	105
4.2.5- Análise dos dados.....	105
4.3-RESULTADOS.....	106
4.4-DISCUSSÃO.....	113
4.5-CONCLUSÕES.....	118

4.6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118
CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES.....	123
APÊNDICES.....	124
Apêndice A – Fase do experimento em campo.....	125
Apêndice B – Processamento das amostras.....	127
Apêndice C– Análises laboratoriais.....	128
Apêndice D – Colônias de <i>Dactylopius opuntiae</i> .....	129

## LISTA DE TABELAS

Páginas

### CAPÍTULO II - Valor nutricional de genótipos de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) infestados com *Dactylopius opuntiae*

Tabela 2.1- Características químicas e físicas do solo e do composto orgânico utilizados nos vasos.....	36
Tabela 2.2- Número de colônias de <i>Dactylopius opuntiae</i> em palma forrageira ( <i>Opuntia</i> e <i>Nopalea</i> ) em diferentes dias de infestação.....	40
Tabela 2.3-Valores de MS, MM, MO e EE de palma forrageira ( <i>Opuntia</i> e <i>Nopalea</i> ) infestadas com <i>Dactylopius opuntiae</i> .....	42
Tabela 2.4-Valores de PB, FDN, FDA e LDA de palma forrageira ( <i>Opuntia</i> e <i>Nopalea</i> ) infestadas com <i>Dactylopius opuntiae</i> .....	43
Tabela 2.5-Valores de HEMI, CEL, CNF e NDT de palma forrageira ( <i>Opuntia</i> e <i>Nopalea</i> ) infestadas com <i>Dactylopius opuntiae</i> .....	44
Tabela 2.6-Frações dos carboidratos da palma forrageira ( <i>Opuntia</i> e <i>Nopalea</i> ) infestadas com o inseto <i>Dactylopius opuntiae</i> .....	45
Tabela 2.7-Parâmetros de digestibilidade e degradabilidade <i>in vitro</i> da matéria seca.....	49
Tabela 2.8-Parâmetros de produção de gases <i>in vitro</i> de genótipos de palma forrageira do gênero <i>Opuntia</i> infestadas com <i>D. opuntiae</i> .....	51
Tabela 2.9-Parâmetros de produção de gases <i>in vitro</i> de genótipos de palma forrageira do gênero <i>Nopalea</i> infestados com <i>D. opuntiae</i> .....	52
Tabela 2.10-Desdobramento e valores médios de produção total de gases (mL g <sup>-1</sup> MS) de genótipos de palma forrageira infestados com <i>D. opuntiae</i> .....	54

### CAPÍTULO III - Metabólitos secundários de genótipos de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) infestados com *Dactylopius opuntiae*

Tabela 3.1-Genótipos de palma forrageira avaliadas com diferentes graus de resistência ao inseto <i>Dactylopius opuntiae</i> .....	75
Tabela 3.2-Características químicas e físicas do solo e do composto orgânico utilizados nos vasos.....	77
Tabela 3.3-Perfil fitoquímico de genótipos de palma forrageira, dos gêneros <i>Opuntia</i> e <i>Nopalea</i> , aos 0, 60 e 90 dias de infestação com o <i>D. opuntiae</i> .....	80

### CAPÍTULO IV - Diversidade genética por RAPD, ITS e ISSR de genótipos de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) com diferentes graus de resistência ao inseto *Dactylopius opuntiae*

Tabela 4.1- Genótipos de palma forrageira avaliados com diferentes graus de	
---	--

	resistência ao inseto <i>Dactylopius opuntiae</i> .....	102
Tabela 4.2-	Lista de marcadores de RAPD utilizados na análise da variabilidade genética em populações de palma forrageira ( <i>Opuntia</i> e <i>Nopalea</i> ) com diferentes graus de resistência ao <i>Dactylopius opuntiae</i> .....	108
Tabela 4.3-	Lista de marcadores de ISSR utilizados na análise da variabilidade genética em populações de palma forrageira ( <i>Opuntia</i> e <i>Nopalea</i> ) com diferentes graus de resistência ao <i>Dactylopius opuntiae</i> .....	109
Tabela 4.4-	Matriz de dissimilaridade genética em populações de palma forrageira ( <i>Opuntia</i> e <i>Nopalea</i> ) com diferentes graus de resistência ao <i>Dactylopius opuntiae</i> .....	110
Tabela 4.5-	Agrupamento de otimização pelo método de Tocher em populações de palma forrageira ( <i>Opuntia</i> e <i>Nopalea</i> ) com diferentes graus de resistência ao <i>Dactylopius opuntiae</i> .....	112
Tabela 4.6-	Coeficiente de correlação cofenética entre a matriz de distância e o método de cluster, gerado a partir da análise da diversidade genética em populações de palma forrageira ( <i>Opuntia</i> e <i>Nopalea</i> ) com diferentes graus de resistência ao <i>Dactylopius opuntiae</i> .....	112

## LISTA DE FIGURAS

	Páginas
 CAPÍTULO II - Valor nutricional de genótipos de palma forrageira ( <i>Opuntia</i> e <i>Nopalea</i> ) infestados com <i>Dactylopius opuntiae</i>	
Figura 2.1-Dados de temperatura e umidade durante a condução do estudo na estufa de vegetação.....	36
Figura 2.2-Volume de gases produzidos durante incubação <i>in vitro</i> de espécies de palma forrageira ( <i>Opuntia</i> e <i>Nopalea</i> ) no tempo 0, 15, 30 45, 60, 75 e 90 dias após infestação.....	59
Figura 2.3-Volume de gases produzidos durante incubação <i>in vitro</i> no tempo 0, 15, 30 45, 60, 75 e 90 dias após infestação em espécies de palma forrageira ( <i>Opuntia</i> e <i>Nopalea</i> ).....	61
Figura 2.4-Secção histológica do genótipo IPA-100003 aos 0 (A), 30 (B) e 60 (C) dias após a infestação com o <i>Dactylopius Opuntiae</i> .....	62
 CAPÍTULO III - Metabólitos secundários de genótipos de palma forrageira ( <i>Opuntia</i> e <i>Nopalea</i> ) infestados com <i>Dactylopius opuntiae</i>	
Figura 3.1-Dados de temperatura e umidade durante a condução do estudo na estufa de vegetação.....	77
Figura 3.2-Dendrograma dimensional representando a similaridade entre o perfil fitoquímico de palma forrageira infestada com <i>D. opuntiae</i> ..	82
Figura 3.3-Espectro de ressonância nuclear magnética de <sup>1</sup> H de genótipos de palma forrageira do gênero <i>Opuntia</i> infestados com <i>Dactylopius opuntiae</i> aos 0, 60 e 90 dias.....	84
Figura 3.4-Espectro de ressonância nuclear magnética de <sup>1</sup> H de genótipos de palma forrageira do gênero <i>Nopalea</i> infestados com <i>Dactylopius opuntiae</i> aos 0, 60 e 90 dias.....	85
Figura 3.5-Biplot de análise de componentes principais (CP1 x CP2) de palma forrageira infestadas com <i>Dactylopius opuntiae</i> aos 0, 60 e 90 dias.....	90
 CAPÍTULO IV - Diversidade genética por RAPD, ITS e ISSR de genótipos de palma forrageira ( <i>Opuntia</i> e <i>Nopalea</i> ) com diferentes graus de resistência ao inseto <i>Dactylopius opuntiae</i>	
Figura 4.1-Produto da amplificação gerada com marcadores de RAPD (OPG15), ISSR (UBC 810) e ITS (1 e 4) em populações de palma forrageira ( <i>Opuntia</i> e <i>Nopalea</i> ) com diferentes graus de resistência ao <i>Dactylopius opuntiae</i> . Padrão utilizado,	



	Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder. 03 = IPA-100003, 04 = IPA-100004, 08 = IPA-200008, 16 = IPA-200016, 21 = IPA-200021, 149 = IPA-200149, 205 = IPA-200205, bp = pares.....	107
Figura 4.2-	Dendrograma construído pelo método de agrupamento hierárquico de Ward em populações de palma forrageira ( <i>Opuntia</i> e <i>Nopalea</i> ) com diferentes graus de resistência ao <i>Dactylopius opuntiae</i> .....	111
Figura 4.3-	Análise de componentes principais em populações de palma forrageira ( <i>Opuntia</i> e <i>Nopalea</i> ) com diferentes graus de resistência ao <i>Dactylopius opuntiae</i> . Grupo I = IPA-100004(2), IPA-200021(5), IPA-200205(7), Grupo II = IPA-100003(1), IPA-200008(3) e IPA-200149(6), Grupo III = IPA-200016(4).....	113

## RESUMO GERAL

O Nordeste é a segunda região política brasileira mais populosa do país, com clima predominantemente semiárido. A pecuária tem sido uma das principais aptidões dessa região no setor primário da economia. Devido à irregularidade das chuvas observada no Semiárido brasileiro, tem-se buscado alternativas para contornar esta situação como o cultivo de plantas forrageiras com características xerófilas, como a palma forrageira. Todavia, nos últimos anos a cochonilha do carmim (*Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Hemiptera: Dactylopiidae)) se transformou em praga muito agressiva, provocando grandes prejuízos econômicos na cadeia produtiva de caprinos, ovinos e bovinos. Este inseto, no ato da sua alimentação, inocula toxinas que provocam o amarelecimento, a queda dos cladódios e, nos casos mais severos, a morte da planta. Assim, objetivou-se caracterizar os genótipos de palma forrageira quanto aos aspectos de interação inseto-planta, químico-bromatológico, metabólicos e genômicos. Foram avaliados quatro genótipos de palma forrageira do gênero *Opuntia* (IPA-100003, IPA-200008, IPA-200016 e IPA -200149) e três do gênero *Nopalea* (IPA-100004, IPA-200021 e IPA -200205). Para os estudos de valor nutritivo, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado e esquema fatorial 7 x 7, que correspondem a 7 genótipos e 7 períodos de coleta (0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de infestação com o *Dactylopius opuntiae*), com 5 repetições para a contagem dos insetos e 3 para as análises laboratoriais. Para os estudos dos metabólitos, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado e esquema fatorial 7 x 3, correspondendo a 7 genótipos e 3 períodos de coleta (0, 60 e 90 dias de infestação com o *Dactylopius opuntiae*), com 3 repetições. Para o nível de infestação, houve efeito de interação ( $P < 0,05$ ) entre os dias de infestação e os genótipos estudados, os quais foram desdobrados. Nas características químico-bromatológicas observou-se interação ( $P < 0,05$ ) entre genótipos e os dias após a infestação em todas as variáveis, com diferenças entre os genótipos e entre os dias ( $P < 0,05$ ), exceto nas variáveis B2 (fibra digerível), EE (extrato etéreo), PB (proteína bruta), NDT (nutrientes digestíveis totais) e CHOT (carboidratos totais) em alguns genótipos. Houve interação ( $P < 0,05$ ) entre genótipos e dias após a infestação em todos os parâmetros de digestibilidade e degradabilidade. Observou-se na variável DIVMS (digestibilidade *in*

*vitro* da matéria seca) significância ( $P < 0,05$ ) entre os genótipos em todos os dias de infestação, assim como para cada genótipo em relação aos dias. Para a variável DEG MS (degradabilidade da matéria seca) observou-se que não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) dos dias 0 aos 45 dias e nos genótipos IPA-100003, IPA-100004 e IPA-200205. Todos os genótipos do gênero *Opuntia* reduziram a produção total de gases ao longo do estudo. Os dias de infestação alteraram o valor nutricional. A pressão de infestação reduziu a produção total de gases em todos os genótipos do gênero *Opuntia*, principalmente no IPA-100003 e IPA-200008, nos quais também foram maiores as quedas de produção de CNF. Nos do gênero *Nopalea* a pressão de infestação influenciou a produção total de gases no IPA-200021, principalmente entre 15 e 60 dias de infestação. Nos estudos dos metabólitos, observou-se a formação de cinco grupos. O gênero *Nopalea* ficou em dois grupos, apenas o IPA-100004 aos 60 dias e o IPA-200021 aos 90 estavam em grupo diferente dos demais. Já o gênero *Opuntia* esteve presente em todos os grupos. O perfil fitoquímico dos genótipos do gênero *Nopalea* não foi alterado pela pressão de infestação. Já no gênero *Opuntia* foi evidente a mudança do perfil fitoquímico na interação inseto-planta, sobretudo nos genótipos IPA-200008 e IPA-100003. Os dois primeiros componentes principais explicaram 81% das variações das medidas originais. Observou-se que os deslocamentos químicos que mais influenciaram na resposta química da planta durante o ataque foram 0,84, 0,88, 1,20, 1,24, 1,28, 3,84, 3,88, 4,04, 4,08 ppm, os quais influenciaram, principalmente, os genótipos aos 60 dias após a infestação. Logo, devem identificar os possíveis compostos nesses deslocamentos e quais poderiam estar relacionados com as respostas da interação inseto-planta. Na genética, o número de fragmentos variou de 5 (primer OPG 10) a 12 (primer OPG 06) para o RAPD, 8 (primers UBC 842 e UBC 864) a 19 (primers UBC 808 e UBC 827) para ISSR e 4 para ITS, com uma média de 8 para 9 loci por marcador de RAPD e 11 para 12 loci por marcador de ISSR. Os genótipos do gênero *Nopalea* estiveram sempre no mesmo grupo, assim como os genótipos IPA-100003 e IPA-200008. Nos métodos de Tocher e de componentes principais, o genótipo IPA-200016 formou um grupo, ressaltando que este genótipo do gênero *Opuntia* é considerado resistente ao *D. opuntiae*. Os genótipos IPA-100004 e IPA-200205 no gênero *Nopalea* e IPA-200008 e IPA-200016 no gênero *Opuntia*, mostraram ser

os mais geneticamente dissimilares, o que significa que eles podem fornecer material genético, ligados ao estudo de genótipos promissores com base em caracteres moleculares, o que permite rápidos ganhos genéticos.

**Palavras-chave:** bromatologia, digestibilidade, interação, cactos, inseto-praga, quimiometria

### GENERAL ABSTRACT

The Brazilian Northeast is the second most populous region the Brazil and presents, predominantly, semi-arid climate. Livestock farming has been one of the main skills of this region. Due to the rainfall irregularity observed in the Brazilian Semi-arid region, alternatives have been sought to overcome this situation, such as the cultivation of forage plants with xerophytic characteristics such as forage palm. However, in recent years the carmine scale (*Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Hemiptera: Dactylopiidae)) has turned into a very aggressive pest causing great economic losses in the productive chain. This insect in the act of feeding inoculates toxins that cause the yellowing, the fall of the rackets and, in more severe cases, the death of the plant. Thus, the objective was to characterize the genotypes of cactus pear on the aspects of insect-plant interaction, chemical-bromatological and metabolomics. Four genotypes of cactus pear of the genus *Opuntia* (IPA-100003, IPA-200008, IPA-200016 and IPA -200149) and three genotypes of the genus *Nopalea* (IPA-100004, IPA-200021 and IPA -200205) were evaluated. For the nutritional value studies, the experimental design was completely randomized and factorial scheme 7 x 7, corresponding to 7 genotypes and 7 collection periods (0, 15, 30, 45, 60, 75 and 90 days of infestation with *Dactylopius opuntiae*), with 5 replicates for the insect count and 3 for the laboratory analyzes. For the studies of the metabolites completely randomized experimental design and 7 x 3 factorial scheme, corresponding to 7 genotypes and 3 collection periods (0, 60 and 90 days of infestation with *Dactylopius opuntiae*), with 3 replicates. For the infestation level, there was an interaction effect ( $P < 0.05$ ) between the infestation days and the studied genotypes, which were deployed. In the chemical-bromatological characteristics, interaction ( $P < 0.05$ ) between genotypes and days after infestation was

observed in all variables, with differences between genotypes and between days ( $P < 0.05$ ), except for variables B2 (digestible fiber), EE (etheral extract), PB (crude protein), NDT (total digestible nutrients) and CHOT (total carbohydrates) in some genotypes. There was interaction ( $P < 0.05$ ) between genotypes and days after infestation in all parameters of digestibility and degradability. Significance ( $P < 0.05$ ) was observed in the variable IVDMD (in vitro dry matter digestibility) between the genotypes on all infestation days, as well as for each genotype in relation to the days. For the variable DEG MS (dry matter degradability) it was observed that there was no significant difference ( $P > 0.05$ ) from days 0 to 45 days and in the genotypes IPA-100003, IPA-100004 and IPA-200205. All genotypes of the genus *Opuntia* reduced total gas production throughout the study. The days of infestation did little to change the nutritional value. Infestation pressure reduced total gas production in all genotypes of the genus *Opuntia*, mainly in IPA-100003 and IPA-200008, which also showed the largest decreases in CNF production. In the genus *Nopalea* the infestation pressure influenced the total production of gases in the IPA-200021, mainly between 15 and 60 days of infestation. In the metabolite studies, the formation of five groups was observed. The genus *Nopalea* was in two groups, only the IPA-100004 at 60 days and the IPA-200021 at 90 years presented a different group from the others. The genus *Opuntia* was present in all groups. The phytochemical profile of genotypes of the genus *Nopalea* was not altered by infestation pressure. In the *Opuntia* genus, it was evident the phytochemical profile change in the insect-plant interaction, mainly in the genotypes IPA-200008 and IPA-100003. The first two major components accounted for 81% of the variations of the original measurements. It was observed that the chemical peaks that most influenced the chemical response of the plant during the attack were 0.84, 0.88, 1.20, 1.24, 1.28, 3.84, 3.88, 4.04, 4.08 ppm, which mainly influenced the genotypes at 60 days after infestation. Therefore, it is necessary to identify the possible compounds in these displacements and which could be related to the responses of the insect-plant interaction. Of the 26 primers used, 24 generated 890 amplified bands, 206 polymorphic loci and 36 monomeric loci. The number of fragments varied from 5 (primer OPG 10) to 12 (primer OPG 06) for RAPD, 8 (primers UBC 842 and UBC 864) at 19 (primers UBC 808 and UBC 827) for ISSR and 4 for ITS, with a mean of 8 for 9 loci per RAPD marker and 11 for 12

loci per marker of ISSR. Genotypes of the genus *Nopalea* not always group, as well as IPA-100003 and IPA-200008. Our methods of Tocher and major components or genotype IPA-200016 formed a group, highlighting the genus of the genus *Opuntia* is considered resistant to *D. opuntiae*. The genotypes IPA-100004 and IPA-200205 in genus *Nopalea* and IPA-200008 and IPA-200016 in genus *Opuntia*, have been shown (in this experiment) to be more genetically dissimilar, meaning that they can provide genetic material, linked to the study of promising genotypes based on characters which allows for rapid genetic gains.

**Keywords:** bromatology, digestibility, interaction, cacti, insect-plague, chemometrics

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

As zonas climaticamente consideradas como Áridas ocupam 41,3% da superfície terrestre, com contingente populacional de 2,1 bilhões de pessoas. Devido à irregularidade das chuvas observada no Semiárido brasileiro, tem-se buscado contornar esta situação, como através do cultivo de plantas forrageiras com características xerófilas como a palma forrageira.

A composição química da palma forrageira pode variar segundo a espécie, o genótipo e a idade do cladódio e suas principais características são: alto conteúdo de água, minerais e carboidratos solúveis, vitaminas, elevada digestibilidade e baixos teores de matéria seca, proteínas e fósforo, além de possuir baixo percentual de parede celular e alta concentração de carboidratos não fibrosos. Desse modo, é inegável o potencial significativo desta cultura para contribuir no desenvolvimento de zonas Áridas e Semiáridas, sobretudo, nos países em desenvolvimento. Todavia, nos últimos anos a cochonilha do carmim (*Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Hemiptera: Dactylopiidae)) se transformou em praga muito agressiva, provocando grandes prejuízos econômicos na cadeia produtiva de pequenos ruminantes e na bovinocultura leiteira.

Este inseto, no ato da sua alimentação, inocula toxinas que provocam o amarelecimento, a queda dos cladódios e, nos casos mais severos, a morte da planta. O *Dactylopius opuntiae* é um inseto de origem mexicana, que geralmente possui ciclo de vida de 90 dias, variando o ciclo em função da temperatura do ambiente. Sua metamorfose é completa, seus estágios de desenvolvimentos são: ovo, primeiro e segundo estágio larval (ninfas I e II, respectivamente), pré-pupa, pupa, fêmeas e machos adultos. Possui grande poder de proliferação e disseminação e em decorrência do clima quente, há vários ciclos reprodutivos ao longo do ano, nos quais as primeiras colonizações surgem entre 8-20 dias após a infestação, com migração das ninfas I para o ápice dos cladódios onde serão levadas pelo vento e/ou por outros agentes ou dispersam para outras ordens de cladódios na planta.

Para se alcançar a sustentabilidade aliada à segurança alimentar, a seleção de genótipos resistentes às pragas e doenças se torna uma das alternativas sustentáveis, de modo que, o estudo sobre os mecanismos de resistências das plantas englobam diversas

ciências como a Biologia, Química, Farmacologia, as quais utilizam a Organografia, Genôma, Proteôma e Metaboloma para encontrar respostas quanto aos processos de resistências. Em palma forrageira, embora existam variedades com diferentes graus de resistencia ao *Dactylopius opuntiae* e com boa produção de biomassa, ainda não são claras as diferenças em níveis metabólicos, as quais poderiam contribuir para o melhoramento genético mais rápido e eficaz.

Sabe-se que as defesas das plantas ocorrem tanto no tempo quanto no espaço por redes reguladoras altamente complexas que são moduladas por interações com outras vias de sinalização, nas quais as defesas podem ser constitutivas ou induzidas, respondendo rapidamente quando são atacadas novamente. No entanto, ainda não são claros todos os mecanismos envolvidos na interação inseto-planta, bem como estudos que avaliem a pressão de infestação no valor nutritivo de plantas forrageiras, os quais poderiam contribuir para o melhoramento genético.

Portanto, parte-se da hipótese de que a caracterização molecular e o perfil metabólico permitem identificar os motivos pelos quais alguns genótipos de palma forrageira são mais susceptíveis à cochonilha do carmim do que outros, uma vez que nos estudos histológicos, a espessura da epiderme não é limitante. Objetivou-se com esta pesquisa caracterizar os genótipos de palma forrageira *Opuntia ficus-indica* Mill, *Nopalea cochenillifera* Salm Dyck, Rose, *Opuntia larreri* F.A.C. Weber e *Opuntia stricta* Haw, quanto aos aspectos de interação inseto-planta, químico-bromatológico, metaboloma e genoma.

Esta tese está dividida em quatro capítulos: Capítulo I – Referencial Teórico - Mecanismos e causas da resistência de plantas a insetos e sua influência no valor nutricional: inferências na interação palma forrageira-cochonilha do carmim; Capítulo II - Valor nutricional de genótipos de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) infestados com *Dactylopius opuntiae*; Capítulo III- Metabólitos secundários de genótipos palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) infestados com *Dactylopius opuntiae* e Capítulo IV - Diversidade genética por RAPD, ITS e ISSR de genótipos de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) com diferentes graus de resistência ao inseto *Dactylopius opuntiae*.



## **CAPÍTULO I**

---

### **Referencial Teórico**

**Mecanismos e causas da resistência de plantas a insetos e sua influência  
no valor nutricional: inferências na interação palma forrageira-  
cochonilha do carmim**

## Referencial Teórico

### **Mecanismos e causas da resistência de plantas a insetos e sua influência no valor nutricional: inferências na interação palma forrageira-cochonilha do carmim**

## RESUMO

Objetivou-se com esta revisão abordar os mecanismos de resistência de plantas a insetos e sua influência no valor nutricional com inferências na interação palma forrageira-cochonilha do carmim. A palma é uma forrageira importante para os pecuaristas de regiões áridas e semiáridas por ser adaptada ao clima. Nutricionalmente, as principais características desta forrageira são: alto conteúdo de água, minerais, carboidratos solúveis, vitaminas e elevada digestibilidade. Com o objetivo de produzir o corante carmim foi importado o inseto *Dactylopius opuntiae*, todavia este possui ação devastadora nos palmais, pois, ao se alimentarem inoculam toxinas, dizimando-os rapidamente. A interação inseto-planta é complexa e dinâmica, uma planta resistente é aquela que é menos danificada que outra, sob igualdade de condições. As características fenotípicas, físicas, morfológicas e/ou químicas são expressadas para torna-las menos infestadas ou injuriadas que outras (suscetíveis), a resistência é hereditária e específica a um determinado inseto, afetando seu comportamento, fisiologia e biologia. Todavia, não existe uma escala absoluta para medir a resistência, sendo usualmente realizado comparações entre plantas e classificando em diferentes graus de resistência. As causas das resistências podem ser químicas, físicas e morfológicas. Para evitar plantas inadequadas, os insetos desenvolveram um sistema sensorial sintonizado para a detecção de sinais do hospedeiro e um sistema nervoso capaz de integrar as entradas de neurônios sensoriais com percepção do espaço-temporal. O mecanismo de ação dos insetos fitófagos, assim como na maioria dos hemípteros, é via apoplasto, penetrando seu estilete em direção ao tubo crivado. A resistência de alguns genótipos à cochonilha-do-carmim ainda é desconhecida. A interação inseto-planta e seus impactos no valor nutricional das plantas forrageiras ainda são escassos. O teor de cinzas e fibra pode correlacionar negativamente com a infestação e os flavonóis e o amido podem

exercer uma correlação negativa significativa, indicando que esses constituintes podem influenciar a biologia e o estabelecimento do inseto. Uma das saídas utilizadas frente às pragas e doenças, sem a utilização de agroquímicos, é através do melhoramento genético, selecionando variedades resistentes ou introduzindo genes que codifiquem compostos de resistência sem que haja perdas do valor nutricional, uma vez que esta prática não provoca danos ao meio ambiente. Sendo assim, torna-se necessário o aprofundamento no estudo dos recursos genéticos, morfoanatômicos, fisiológicos e bioquímicos destas plantas correlacionando com maiores produções e produtividades, tolerância à seca, além de resistência as diversas pragas.

**Palavras-chaves:** bromatologia, cactáceas, digestibilidade, interação, inseto-praga, nutrição de ruminantes, Semiárido

**Mechanisms and causes of plant resistance to insects and their influence on nutritional value: inferences on the interaction of cactus pear-carmines cochineal**

**ABSTRACT**

The objective of this review was to examine the mechanisms of resistance of plants to insects and their influence on nutritional value with inferences in the cactus pear- insect carmine interaction. Cactus pear is an important fodder for ranchers from arid and semi-arid regions because it is adapted to the climate. Nutritionally, the main characteristics of this forage are: high water content, minerals, soluble carbohydrates, vitamins and high digestibility. In order to produce the carmine dye, the insect *Dactylopius opuntiae* was imported, but this one has a devastating effect on the cactus pear, because, when feeding, they inoculate toxins, decimating them rapidly. The insect-plant interaction is complex and dynamic, a resistant plant is one that is less damaged than another under equal conditions. Phenotypic, physical, morphological and/or chemical characteristics are expressed to make them less infested or injured than others (susceptible), resistance is hereditary and specific

to a particular insect, affecting its behavior, physiology and biology. However, there is no absolute scale to measure resistance, and comparisons are usually made between plants and grading different degrees of resistance. The causes of resistance can be chemical, physical and morphological. To avoid inadequate plants, insects developed a tuned sensory system for the detection of host signals and a nervous system capable of integrating the inputs of sensory neurons with spatio-temporal perception. The mechanism of action of phytophagous insects, as in most of the hemiptera, is via apoplast, penetrating its stylet into the sieve tube. The resistance of some genotypes to carmine scales is still unknown. The insect-plant interaction and its impacts on the nutritional value of forage plants are still scarce. The ash and fiber content of the fruits may negatively correlate with infestation and that flavonols and starch may exert a significant negative correlation, indicating that these constituents may have influenced the biology and establishment of the insect. One of the outlets used against pests and diseases, without the use of agrochemicals, is through genetic improvement, selecting resistant varieties or introducing genes that encode resistance compounds without loss of nutritional value, since this practice does not cause damage to the environment. Therefore, it is necessary to deepen the study of the genetic, morphoanatomic, physiological and biochemical resources of these plants, correlating with higher yields and yields, tolerance to drought, and resistance to various pests

**Key-words:** bromatology, cactaceae, digestibility, interaction, insect-pest, ruminant nutrition, Semiarid

## 1.1- INTRODUÇÃO

Em seus ecossistemas, as plantas são submetidas a diversos fatores estressantes, tanto os bióticos como os abióticos. No entanto, os vegetais por meio de seleção natural e mudanças evolutivas desenvolveram e ainda desenvolvem mecanismos de defesa, quer mudando a composição e as propriedades da parede celular ou mudando seu metabolismo, primário e secundário, o que proporcionou o surgimento de compostos tóxicos, retardantes e mais isolantes, os quais foram transferidos para os seus descendentes. Em contrapartida,

os insetos utilizam diversos mecanismos fisiológicos e comportamentais para se adaptarem as defesas das plantas, transferindo-os geneticamente para seus descendentes. Segundo Panis et al. (2016), as plantas são capazes de sintetizar uma vasta gama de metabólitos secundários que servem como defesa ao ataque de herbívoros, por outro lado, os insetos podem responder com contra-adaptações para contornar as defesas químicas de plantas, conduzindo a mudanças fenotípicas e genéticas.

Para as plantas equilibrarem o investimento de recursos entre a defesa e a manutenção de processos químicos essenciais ao desenvolvimento e à reprodução, duas estratégias são utilizadas: a tolerância e a resistência, em que as plantas resistentes minimizam os danos causados pelos insetos, com defesas químicas e físicas, à custa de perdas de desempenho. Entretanto nas tolerantes não há perdas de desempenho, pois a interação que ocorre é de mutualismo (Falcão et al., 2013).

Sabe-se que as defesas das plantas ocorrem tanto no tempo quanto no espaço por redes reguladoras altamente complexas que são moduladas por interações com outras vias de sinalização, nas quais as defesas podem ser constitutivas ou induzidas, respondendo rapidamente quando são atacadas novamente (Bruce et al., 2015). No caso dos insetos sugadores, por exemplo, a composição da seiva do floema não só influencia na decisão do inseto de aceitar ou rejeitar um hospedeiro, mas também determinará o crescimento e a reprodução (Pritchard et al., 2007).

Na palma forrageira os relatos demonstram que o inseto cochonilha-do-carmim (*Dactylopius opuntiae*) passou a destruir os palmais a partir de 2001, dizimando-os rapidamente em virtude de sua alta proliferação e disseminação, comprometendo as cadeias produtivas como a bovinocultura leiteira, estimando-se perdas de mais de 100 mil hectares de palma (Lopes et al., 2009). Portanto, objetivou-se com esta revisão abordar os mecanismos de resistência de plantas a insetos e sua influência no valor nutricional com inferências na interação palma forrageira-cochonilha do carmim.

## **1.2 - USO DA PALMA COMO FORRAGEIRA (*Opuntia* e *Nopalea*) E A INFESTAÇÃO COM *D. opuntiae***

A palma é uma forrageira importante para os pecuaristas de regiões áridas e semiáridas por ser adaptada ao clima em virtude do uso eficiente da água (eficiência na absorção, aproveitamento e perda), que ocorrem devido ao seu mecanismo fotossintético MAC (metabolismo ácido das crassuláceas). Dessa forma, a palma representa uma importante reserva forrageira, rica em água e energia, características significativas para a sustentabilidade da pecuária nordestina, utilizada como base alimentar para o gado leiteiro na época seca, principalmente nos estados de Pernambuco, Alagoas, Paraíba e Sergipe (Lima et al., 2009).

Nutricionalmente, as principais características desta forrageira são: alto conteúdo de água, minerais, carboidratos solúveis, vitaminas e elevada digestibilidade, apresentando variações em sua composição química em função da espécie, variedade, ordem do cladódio, estágio fenológico e fisiológico, condições edafoclimáticas, dentre outros (Gomes, 2011).

Com o objetivo de produzir o corante carmim, foi importado o inseto *Dactylopius opuntiae* que, embora produza o corante, não possui boa qualidade para a exploração comercial, principalmente quando comparado ao produzido pelo *Dactylopius coccus* (Lopes et al., 2009). Além disso, dentre as 10 espécies desse gênero, a *D. opuntiae* possui ação devastadoras nos palmais, principalmente nos do gênero *Opuntia* (Rodrigo et al., 2010, Van Dam e May, 2012), pois, ao se alimentarem inoculam toxinas que provocam o amarelamento e a queda dos cladódios, podendo ocorrer a morte da planta (Vasconcelos et al., 2009). O inseto *D. opuntiae* passou a destruir os palmais no nordeste brasileiro a partir de 2001, dizimando-os rapidamente em virtude de sua alta proliferação e disseminação, comprometendo, conseqüentemente, a caprinocultura e a bovinocultura (Lopes et al., 2009; Vasconcelos et al., 2009), provocando grandes prejuízos econômicos.

O gênero *Dactylopius*, cujo centro de origem é entre o México, Andes peruanos e Chile, é o único da família Dactylopiidae (Hemiptera: Coccoidea) e são especializadas em cactáceas dos gêneros *Opuntia* e *Nopalea*. As 10 espécies reconhecidas desse gênero são: *D. coccus* Costa, *D. ceylonicus* (Green), *D. confusus* (Cockerell), *D. tomentosus* (Lamarck), *D. opuntiae* (Cockerell), *D. confertus* De Lotto, *D. austrinus* De Lotto, *D. salmianus* De Lotto, *D. zimmermanni* De Lotto e *D. gracilipilus* sp. nov (Rodrigo et al., 2010; Van Dam e May, 2012).

O ciclo de vida desse gênero varia de 60 a 120 dias, sua metamorfose é completa, seus estágios de desenvolvimentos são: ovo, primeiro e segundo estágio larval (ninfas I e II), pré-pupa, pupa, fêmeas e machos adultos. Possui um grande poder de proliferação e disseminação, favorecido pela ausência de inimigos naturais no Brasil e em decorrência do clima quente que estimula vários ciclos reprodutivos ao longo do ano (Lopes et al., 2009). As fêmeas adultas são inertes e sugam a seiva, enquanto os machos são alados (sobrevivem apenas três dias, morrendo após o acasalamento), as migrantes se locomovem para o ápice da palma para serem dispersas pelo vento (Rodrigo et al., 2010).

### **1.3 - TIPOS DE RESISTÊNCIA DE PLANTAS A INSETOS**

A interação inseto-planta é complexa e dinâmica, a qual envolve processos que ao longo do tempo produziu uma enorme variação de características tanto para o inseto como para a planta, num sistema onde um age ou reage em função da resposta do outro. Inicialmente ocorrem modificações muito discretas que ao longo do processo evolutivo vão se intensificando até que passam a ser entendidas como respostas à pressão de seleção do meio (Aoyama e Labinas, 2012).

Uma planta resistente é aquela que é menos danificada que outra, sob igualdade de condições. As características fenotípicas, físicas, morfológicas e/ou químicas são expressadas para torná-las menos infestadas ou injuriadas que outras (suscetíveis), a resistência é hereditária e específica a um determinado inseto, afetando seu comportamento, fisiologia e biologia (Boiça Júnior et al., 2013). Todavia, não existe uma escala absoluta para medir a resistência, sendo usualmente realizadas comparações entre plantas e classificando em diferentes graus de resistência, como: Imunidade = não sofre nenhum dano causado pela praga sob qualquer condição; Alta resistência = sofre pouco dano em determinadas condições; Resistência moderada = sofre um dano menor que o dano médio causado nas variedades; Suscetibilidade = sofre dano semelhante ao dano médio sofrido pelas variedades; Alta suscetibilidade = sofre dano bem maior do que a média das variedades (Lara, 1991).

Quanto ao tipo de resistência ou categorias funcionais essas podem ser: antixenose ou não preferência, antibiose e tolerância, as quais não ocorrem de forma isolada, sendo comum a combinação dessas características (Lara, 1991; Gullan e Cranston, 2007). Antixenose ou não preferência ocorre quando o genótipo é menos utilizado para alimentação, oviposição ou abrigo em comparação com outro sob as mesmas condições, necessitando de estímulos para localização (atraente/repelente), para interrupção ou não da movimentação (arrestante/repelente) para início ou não da alimentação (iniciante/supressores) e para manutenção ou não da alimentação (estimulante/deterrentes). Os fatores que induzem a não preferência podem ser físicos ou químicos e neste caso, os mecanismos de resistência estão mais relacionados com as respostas do inseto do que da planta, afetando diretamente o seu comportamento (Boiça Júnior et al., 2013).

Na antibiose ocorre a mortalidade nas fases larval, ninfal ou pupal, redução de peso e tamanho de indivíduos (Lara, 1991), ou seja, o mecanismo de resistência utilizado pelas plantas é de natureza química ou nutricional, afetando negativamente a biologia do inseto sem interferir no seu comportamento alimentar, causando mortalidade, menor peso e crescimento, deformações e aumento no ciclo de vida (Boiça Júnior et al., 2013). Este mecanismo está diretamente relacionado à presença de toxinas, inibidores de crescimento ou reprodução.

Na tolerância nem o comportamento e nem a biologia do inseto são afetados (não há pressão de seleção sob o inseto), os danos causados, conforme Gullan e Cranston (2007), não acarretam em perdas significativas, pois as plantas suportam certo grau de injúria. As plantas conseguem se recuperar das injúrias e alcançar produtividades iguais as plantas não atacadas, pois seu crescimento e produção não são afetados em virtude do aumento da taxa fotossintética líquida, desenvolvimento de estruturas morfológicas e ação de fito-hormônios e enzimas oxidativas (Boiça Júnior et al., 2013).

As causas das resistências podem ser químicas, físicas e morfológicas. As físicas estão relacionadas com cor, forma e tamanho do substrato vegetal os quais afetam a intensidade da energia radiante, no qual as cores emitidas podem ser atraentes ou repelentes. Nas químicas existem substâncias que afetam o comportamento dos insetos, podendo ser estimulantes da alimentação, deterrentes ou atraentes e substâncias que afetam



o metabolismo dos insetos como a nicotina, piretro, rotenona, gossipol e taninos, que podem retardar o crescimento ou impedir a mudança. As causas morfológicas estão relacionadas à pilosidade, espessura e dureza da epiderme, textura, dimensão e disposição dos órgãos vegetais. Salienta-se que os fatores ambientais como temperatura, luminosidade, fertilidade do solo e umidade podem influenciar nos níveis de resistência de plantas, assim como fatores inerentes as plantas (idade, parte atacada, danos anteriores) e aos insetos (espécie, raça biótipo, tamanho da população) (Lara, 1991).

#### **1.4 - MECANISMO DE DEFESA DOS INSETOS E MECANISMOS DE AÇÃO NA INTERAÇÃO INSETO-PLANTA**

Para evitar plantas inadequadas os insetos desenvolveram um sistema sensorial sintonizado para a detecção de sinais do hospedeiro e um sistema nervoso capaz de integrar as entradas de neurônios sensoriais com percepção do espaço-temporal. O reconhecimento dos odores (semioquímicos), utilizando um mecanismo de detecção de coincidência, dos hospedeiros e dos não hospedeiros ocorre por meio das substâncias voláteis emitidas pelas plantas, podendo ser uma ou várias substâncias associadas, que quando combinadas ao reconhecimento visual, torna o hospedeiro mais atrativo (Bruce, 2015).

A exigência nutricional dos insetos pode influenciar os seus mecanismos de defesa. Sabe-se que os insetos necessitam em sua dieta de aminoácidos, proteínas, lipídios, esteróis, carboidratos, vitaminas e sais minerais e que estes variam em função da idade, sexo e função exercida na população (Fortes, 2005). Os macro (N, P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn e Zn) presentes nas plantas exercem importante papel não apenas para o crescimento, mas também para sua defesa contra insetos e patógenos (Span e Schumann, 2010). Assim, em situação na qual a concentração de nutrientes na planta está desbalanceada para o inseto, pode constituir em uma vantagem contra a herbivoria.

Os estudos de expressão genômica verificaram que as adaptações co-evolutivas fizeram com que os insetos superassem algumas defesas como as monooxigenases do citocromo P450 que podem ser utilizados pelos insetos para desintoxicarem-se, como

ocorre com a lagarta do algodão que usa P450 para se desintoxicar do gossipol ou utilizam um metabolito presente na planta para se defender de seu predador (Bruce, 2015).

O mecanismo de ação dos insetos fitófagos, assim como na maioria dos hemípteras, é via apoplasto, penetrando seu estilete (há dois canais: nutrição e salivar) em direção ao tubo crivado. Conforme Will et al. (2013) o estilete é constituído por quatro subunidades, duas partes mandibulares externas que possui os canais nervosos e duas internas do maxilar que formam o canal de nutrição e o canal salivar. Por meio da saliva, inicia-se o processo de interação, produzindo uma saliva gelatinosa na superfície da planta, que à medida que o estilete se aproxima do floema, a saliva passa a envolvê-lo, formando uma espécie de bainha, protegendo contra a força mecânica e ações químicas, impedindo a indução de respostas de defesa.

No tubo crivado o inseto, antes da ingestão, secreta uma saliva aquosa, provavelmente rica em proteases, que digerem proteínas da seiva. A aceitação da planta hospedeira se dá por uma prévia análise de sua seiva através da quimiosensores. Geralmente as salivas dos insetos são constituídas de glicose oxidase,  $\beta$ -glicosidase, peptídeos e conjugados de ácidos graxos (volicitina) que podem desencadear respostas de defesa da planta ou suprimir a defesa (Will et al., 2013; Bruce, 2015).

As secreções orais de insetos possuem proteínas e produtos químicos específicos que evoluíram como efetores para inibir as defesas das plantas, todavia, com o tempo algumas plantas se adaptaram para reconhecer algumas dessas substâncias como celulases, pectinases, proteases e passaram a disparar respostas de defesa, induzindo as rotas do ácido jasmônico e do ácido salicílico. Em *Nicotiana benthamiana* os efetores Mp10 e Mp42 reduziram a fecundidade de pulgões (beneficiando a planta hospedeira), já o MpC002 aumentou, possivelmente em virtude das plantas possuírem receptores que detectem Mp10 e Mp42 e desencadeiam o metabolismo de defesa (Bruce, 2015).

Quando a saliva não suprime a resposta de defesa da planta, são ativados os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  na membrana plasmática dos elementos crivados para a formação de calose (polímero  $\beta$ -1,3-glicano), afetando os níveis de cálcio e o estado redox, que são sistematicamente sinalizados e induzem a obstrução dos poros dos elementos crivados para evitar a perda da seiva. Salienta-se que uma outra alternativa de obstrução é por meio das proteínas (P-

proteínas), que possui ação em segundos sob numerosas formas de agregação (amorfo, granular, fibrilar, filamentososo, tubular ou cristalino). Como exemplificação, tem-se as lectinas, as quais são conhecidas como proteínas inseticidas. A deposição de calose e a obstrução da proteína funcionam em paralelo, as P-proteínas se desenvolve rapidamente e as caloses mais lentamente (Will et al., 2013).

Em resposta ao dano mecânico ou pela herbivoria por insetos, todas as plantas emitem produtos derivados de lipídeos. Em muitos casos, eles atraem inimigos naturais do inseto atacante, muitos desses compostos permanecem ligados à superfície da folha e atuam como inibidores do forrageamento devido ao seu sabor. Certas substâncias voláteis emitidas por plantas infestadas também podem atuar como sinais para que as plantas vizinhas, não infestadas, iniciem a expressão de genes relacionados à defesa (Mi-1, Bph14 e Vat) (Taiz e Zeiger, 2013; Bruce, 2015).

Algumas moléculas são utilizadas pelas plantas para resistirem a herbivoria, a quantidade e a intensidade da utilização dessas moléculas dependerão das interações induzidas pelos herbívoros. Essas moléculas, produzidas de forma induzida, visam retardar o crescimento e desenvolvimento do inseto, geralmente interferindo na alimentação, digestão e integridade intestinal. Essas moléculas podem ser de natureza proteica (inibidores de proteases, peptidases, degradadoras de aminoácidos, polifenóis oxidases, lectinas, as relacionadas à patogênese e as ricas em cisteínas) ou originárias do metabólito secundário (compostos fenólicos, isoterpenóides e compostos nitrogenados) (Kant et al., 2015).

A maioria dos alcaloides, por exemplo, interage com os componentes do sistema nervoso, em especial os neurotransmissores, outros afetam o transporte de membrana, a síntese proteica ou a atividade de várias enzimas (Taiz e Zeiger, 2013). Na maioria dos insetos, os alcaloides como os pirrolizidínicos são rapidamente reduzidos a alcaloides terciários hidrofóbicos não carregados, os quais são tóxicos e facilmente atravessam as membranas (Fürstenberg-Hägg et al., 2013).

## **1.5 - MECANISMO DE RESISTÊNCIA DE PALMA FORRAGEIRA AO *D. opuntiae*: ALGUMAS INFERÊNCIAS**

A resistência de alguns genótipos a cochonilha-do-carmim ainda é desconhecida, pois acreditava-se que a espessura da epiderme fosse a principal responsável pela resistência. No entanto, os resultados foram inconsistentes (Moura, 2012), necessitando de estudos mais detalhados, averiguando demais estruturas presentes na palma como as drusas e canais de mucilagem, sua disposição no tecido vegetal, a densidade das células, a quantidade de cálcio e silício presentes na lamela e o perfil metabólico.

O *Dactylopius opuntiae* é um inseto de origem mexicana, que geralmente possui ciclo de vida de 90 dias, variando o ciclo em função da temperatura do ambiente. Há vários ciclos reprodutivos ao longo do ano, nos quais as primeiras colonizações surgem entre 8-20 dias após a infestação, com migração das ninfas I para o ápice dos cladódios onde serão levadas pelo vento e/ou por outros agentes ou dispersam para outras ordens de cladódios na planta, locomovendo-se em média 0,84 cm/s (Lopes et al., 2009; Lopes et al., 2010).

As características morfológicas podem atuar negativamente sobre o inseto. Dessa forma, os estudos da interação palma forrageira-*D. opuntiae* iniciaram avaliando essas características. Conforme Arruda e Melo-de-Pinna (2015) a família Cactaceae apresenta elevada frequência estomática, presença de córtex paliçádico, grande quantidade de espaços intercelulares, feixes corticais e medulares, modificações no lenho e a presença de skin (epiderme juntamente com a hipoderme). Em algumas espécies a hipoderme pode apresentar paredes com diferentes padrões de espessamento, como anelar (Opuntioideae) ou lamelar com o lume irregular (Cactoideae), com presença de drusas com distribuição contínua na primeira camada de células, sendo que nas Opuntioideae os cristais são agregados do tipo drusa. Salienta-se que as camadas do parênquima clorofiliano variam em cada espécie, podendo ser de 4-8 camadas, com presença de drusas que se diferenciam morfológicamente daquelas presentes na hipoderme.

As espécies de *Opuntia* sp. apresentam epiderme uniseriada (plana-papilosa), revestida por cutícula, com paredes reta-sinuosas, com estômatos localizados superficialmente ou abaixo das células epidérmicas (hexacítico ou paracítico). Seus tricomas podem ser glandulados e não-glandulados, unisseriados e unicelulares ou multicelulares (Arruda e Melo-de-Pinna, 2015). Em seguida, há um tecido de revestimento

secundário (periderme) que substitui a epiderme, oriundo do meristema secundário (felogênio), que origina a periderme e súber/felema (casca), nas quais pode haver o acúmulo de compostos fenólicos (Arruda e Melo-de-Pinna, 2010).

Os aspectos anatômicos em palma para averiguar a resistência ao *D. opuntiae* foram conduzidos por Silva et al. (2010), com as variedades IPA-200174 e IPA-200021 (resistentes), IPA-100001 e IPA-100003 (susceptíveis), salientando que apenas a variedade IPA-200021 pertence ao gênero *Nopalea*. A IPA-200174 possuiu a maior proporção de epiderme e cutícula (39,24 e 220,41  $\mu\text{m}$ , respectivamente), diferindo da IPA-100003 quanto à espessura dos feixes vasculares, principalmente xilema (12,13 e 16,61  $\mu\text{m}$ , respectivamente) e o IPA-200021 teve a maior relação perímetro/área de mesofilo, apresentando maior concentração de tecido fotossintético. Nota-se que neste trabalho os resultados apresentados levam a crer que as defesas físicas da *Opuntia* seriam responsáveis pela resistência da palma ao *D. opuntiae*. Entretanto, em estudos conduzidos por Lopes et al. (2010) em variedades de palma resistente, retirando a sua cutícula durante 60 dias, verificaram que os mesmos permaneceram resistentes. Sendo assim, a espessura da cutícula não limitou a colonização do inseto.

A epiderme, juntamente com a cutícula e a hipoderme colenquimática, em palma forrageira constitui em barreiras físicas durante a colonização da microbiota ruminal as partículas de alimento, o que poderia ser análogo ao inseto herbívoro. Todavia, como observado por Moura (2012), após 24 h de incubação *in situ*, apenas a epiderme e a cutícula não apresentaram digestão total, no qual as variedades susceptíveis (IPA-100003) e resistente (IPA-200205) possuíam parede espessa, o que a levou a concluir que a resistência provavelmente não está relacionada à área e espessura da epiderme e hipoderme.

A cutícula é composta por ceras, cutina e carboidratos que cobrem as células epidérmicas como uma película impermeabilizante e pode conferir resistência. Todavia, nem sempre as cutículas protegem a planta dos insetos, há casos como na *Opuntia* spp., no qual o conteúdo de cera não é um mecanismo de defesa as investidas do *D. opuntiae* uma vez que a mais susceptível (IPA-100003) apresentou de 44 a 48  $\mu\text{cm}^3$ , a tolerante (IPA-200008) de 26 a 28  $\mu\text{cm}^3$  e a resistente (IPA-200016) de 31 a 33  $\mu\text{cm}^3$ . Contudo, o menor conteúdo de ceras pode favorecer mobilidade de outros insetos que são inimigos naturais

(Neuroptera, Coleoptera e Hemiptera), porém em virtude da sua camada cerosa esse mecanismo de ação torna pouco eficaz (Falcão et al., 2013).

Em estudo anatômico e histoquímico conduzido por Noronha (2017) com variedades de palma com variados graus de resistência a cochonilha-do-carmim (IPA-100003-susceptível; IPA-200008 e IPA-200021-resistencia intermediária; IPA-100004; IPA-200149 IPA-200016; e IPA-200205- resistentes) observou que a espessura da cutícula foi maior no IPA-100003, a epiderme é levemente ondulada nas variedades IPA-100003, IPA-100004, IPA-200008 e IPA-200021 e plano com paredes retas nas demais. Todas as variedades possuem a epiderme constituída por uma única camada de células, diferenciando-se apenas em espessura, no qual a variedade susceptível possui maior espessura. A formação de periderme na epiderme foi observada nas variedades IPA-200004, IPA-200016 e IPA-200149 e as demais só apresentaram início da formação. Quanto à hipoderme, as variedades IPA-200008 e IPA-200016 apresentaram 2-3 camadas e as variedades IPA-100003 e IPA-200149 4-5 camadas, as demais entre 3-4 camadas. A presença de tricomas e de drusas em elevadas quantidades nas células da hipoderme foi observada apenas nas variedades IPA-200008 e IPA-200003. Logo, esse estudo demonstra que as características morfológicas não possuem nenhuma relação com as defesas da palma frente à infestação com *D. opuntiae*, acreditando-se que as defesas químicas seriam os mecanismos utilizados como defesa.

As defesas químicas provavelmente são as causas da resistência da palma forrageira aos *D. opuntiae* uma vez que estudos histo-anatômicos não identificaram relação do perfil anatômico com a resistência (Lopes et al., 2010; Moura, 2012; Noronha, 2017). Em estudo conduzido por Panis et al. (2016), com larvas de *Drosophila* criadas em *Opuntia sulphurea* e *Trichocereus terscheckii*, com e sem adição de alcaloides, ricos em mescalina e feniletilamina que foram extraídos do último cacto, observaram que os perfis de expressão do genoma do inseto foram amplamente modulados pelo ambiente de criação, sobretudo em virtude dos alcaloides. Genes das famílias citocromo P450 e glutathione S-transferase foram identificados e estão envolvidos com a desintoxicação, oxirredução, respostas ao estresse e a processos neurobiológicos. A redução da viabilidade e o aumento do tempo de desenvolvimento foram as principais consequências observadas nesse estudo. Estudos

como este são necessários para compreender os processos bioquímicos e fisiológicos do *D. opuntiae* durante a alimentação com variedades de palmas com diferentes graus de resistência, avaliando também o perfil metabólico das variedades, buscando detectar os compostos atraentes ou repelentes, estimulantes ou deterrentes.

Em revisão de literatura foram identificados 90 compostos na palma, dentre eles quercetina, campferol, quercetina 3-O-metil éter, 2,3-dihidrocampferol, isorametina 3-O-glicosídeo, 2,3-di-hidroquercetina, ácido cumárico, campferol 7-O-glicosídeo, ácido ferúlico, isorametina 3-O-neo-peridosídeo, isorametina 3-O-rutinosil-4'-O-β-D-glucosídeo, isorametina 3-O-(2,6-diramosil) glucosídeo, zataroside-A. A predominância são de flavonóides, seguidos por ácidos fenólicos, são identificados ainda taninos, terpenos, alcalóides, aminas e betalainas (Saleem et al., 2006; Guevara-Figueroa et al., 2010; Msaddak et al., 2017).

O extrato de algumas espécies de cochonilhas como *Dactylopius austrinus*, *D. ceylonicus*, *D. opuntiae* e *D. tomentosus* são usadas com eficácia no controle de plantas indesejáveis em alguns países, sendo considerados os mais efetivos no controle de agentes biológicos, todavia, se desconhece suas ações prejudiciais em *Opuntia* sp., que suportam grandes populações de *D. coccus* sem serem afetados (Zimmermann e Granata, 2002) durante 7 anos, enquanto uma alta população de *D. opuntiae* pode matar em 6 meses (Llenderal e Campos 2001 *apud* Pérez-Ramirez et al., 2014). Em estudos conduzidos por Pérez-Ramirez et al. (2014) testando a ação repelente e/ou tóxica de Eugenol, 1,8-Cineol e Mentol (terpenóides) e do extrato de *D. opuntiae* (devido ao ácido cármico) em ninfas de *D. opuntiae*, observaram menor fixação das ninfas nos tratamentos eugenol 0,2%, extrato *D. opuntiae* 0,002% e mentol 0,02% com redução de ninfas de 71, 67 e 63%, respectivamente em relação ao tratamento controle.

Estudos com infestação com o *D. opuntiae* em palma, averiguando o perfil metabólico durante as pressões de infestação, tanto no inseto como nas plantas, podem identificar qual ou quais compostos estão relacionados à resposta da planta aos insetos e como estes agem de forma negativa no inseto, causando retardo no ciclo ou até mesmo a morte. Sabe-se que alguns flavonoides, abundantes na palma, possuem ação inseticida,

como a rotenona, rutina, quercetina e campferol, contudo não se sabe se o mesmo pode ocorrer com o *D. opuntiae*.

Em estudo conduzido por Falcão et al. (2013), com infestação de *D. opuntiae*, o conteúdo de ácidos livres foi elevado no genótipo de palma susceptível (IPA-100003), com queda da produção de proteína solúvel quando 100% dos cladódios do IPA-100003 estavam infestados, ao contrário dos genótipos resistente (IPA-200016) e tolerante (IPA-200008). A palma tolerante teve o seu conteúdo de proteína elevado e reduziu o teor aminoácido livres aos 100% da infestação. Esse comportamento pode estar relacionado à utilização dos aminoácidos no metabolismo secundário para combater a ação dos insetos, tornando o seu sabor menos atraente, sem perdas de produtividade. Na variedade resistente houve maior mobilização dos mecanismos de defesa, gerando um maior gasto de energia e menor acúmulo de biomassa.

O perfil proteico ou algumas proteínas específicas, como lectinas e inibidores de proteases, podem ser causas de resistência. Na palma forrageira a resistência de algumas variedades ao *Dactylopius opuntiae*, pode estar relacionada ao seu perfil proteico, sobretudo, quanto aos níveis e tipos de proteínas inseticidas. O isolamento de lectinas em *Opuntia ficus-indica* foi possível em estudos conduzidos por Santana et al. (2009), que identificaram a 8,4kDa a OfiL (*Opuntia ficus indica* Lectin), uma proteína ácida, que poderia estar relacionada a resistência de algumas variedades de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) a cochonilha-do-carmim e contribuir no melhor gerenciamento do melhoramento genético, consequentemente, dispor para o mercado variedades resistentes e com menor dependência de agroquímicos.

Na determinação das composições voláteis e toxicidade seletiva ou atração dos cactos necróticos de *Opuntia littoralis* em *Drosophila melanogaster*, *D. mojavensis wrighti*, e *D. mojavensis sonorensis*, observou-se diferenças de toxicidade e preferência olfativa, as *D. mojavensis* apresentaram toxicidade para benzaldeído e 2-nonanona, enquanto o ácido butanóico e o ácido palmítico foram tolerados em altas concentrações. *D. m. wrighti* demonstrou uma maior preferência olfativa por anisole, ácido butanóico, 2-heptanona e ácido palmítico e a *D. m. Sonorensis* por hexadecano, ácido octanóico e ácido oleico (Wright e Setzer, 2014). Possivelmente, alguns compostos voláteis presentes nas variedades



susceptíveis podem atrair o *D. opuntiae*, pois observou-se que antes da indução da infestação (comunicação pessoal) alguns exemplares da variedade susceptível apresentaram colônias, mesmo aqueles exemplares distantes, ou seja, com tantas variedades próximas ao local de proliferação do inseto, estes preferiram atravessar por todas essas opções (variedades resistentes e tolerantes) em busca da variedade susceptível.

A idade da planta pode ser um dos fatores que influenciam na manifestação da resistência. Em estudo conduzido por Lenzi et al. (2006) em *Opuntia monacantha* atacada por *Cactoblastis cactorum*, observaram que apenas as plantas maiores eram predadas e atribuíram esse comportamento a maior concentração ou liberação de atrativos como os terpenóides. Assim, idade da planta pode influenciar na proliferação da infestação, acreditando-se que na interação palma-forrageira-*D. opuntiae* os cladódios jovens são mais susceptíveis do que os maduros, mesmo naqueles considerados resistentes, (observações pessoais) em virtude de compostos atraentes produzidos durante essa fase ou pela facilidade de alcance dos floemas, sobretudo para as fêmeas jovens, que poderiam não os alcançar devido ao comprimento dos seus estiletes.

## **1.6 - INFLUÊNCIA DA RELAÇÃO INSETO-PLANTA NO VALOR NUTRICIONAL**

A interação inseto-planta e seus impactos no valor nutricional das plantas forrageiras ainda são escassos. Ao realizar um levantamento sobre as interações inseto-planta na composição química, Khan et al. (2015) cita que o maior conteúdo de fenol pode aumentar a resistência à broca da fruta. O teor de cinzas e fibra dos frutos pode correlacionar negativamente com a infestação e que os flavonóis e o amido podem exercer uma correlação negativa significativa, indicando que esses constituintes podem ter influenciado a biologia e o estabelecimento da broca, desempenhando um mecanismo de resistência do tipo antibiose. Já os açúcares solúveis, as proteínas e a umidade podem atuar como fagoestimulantes. Shah et al. (2016) mencionou que pode haver correlação positiva e significativa entre proteínas brutas, lipídios, teor de umidade, cálcio, redução de açúcar, zinco e magnésio com a densidade dos insetos, reforçando que o baixo teor de umidade

contribui para a resistência e que os teores de cinzas possuem propriedades deterrentes quando em altos teores.

Sabe-se que nas plantas infestadas podem ocorrer alterações nas fases fenológicas, redução de carboidratos solúveis e alteração no padrão de alocação de nitrogênio e carbono (Congio et al., 2012). Estudos conduzidos por Falcão et al. (2013) com três variedades de *Opuntia* infestadas com *Dactylopus opuntiae*, averiguaram que os teores de açúcares solúveis variam em função do genótipo e da época do ano, no genótipo susceptível (IPA-100003) ao *D. opuntiae*, foram encontrados valores de 64 a 82 mmol kg<sup>-1</sup> MS, na tolerante (IPA-200008) de 46 a 60 mmol kg<sup>-1</sup> MS e na resistente (IPA-200016) de 68 a 104 mmol kg<sup>-1</sup> MS. Desta forma, os teores de açúcares não influenciaram na resistência.

Avaliando o padrão de alocação de reservas orgânicas em *Brachiaria brizantha* cv. Marandu sob níveis de infestações (0, 5, 10, 20 e 40 insetos adultos vaso<sup>-1</sup>) de cigarrinhas adultas do gênero *Mahanarva* (Hemiptera: Cercopidae), no qual ao final desse período as plantas foram cortadas para observar a capacidade de rebrota aos 0, 20, 30, 40 e 50 dias após o corte, Congio et al. (2012) observaram que a concentração de nitrogênio total no resíduo e nas raízes foi influenciada pela interação entre níveis de infestação e período de rebrota, no qual a concentração de N decresceu com o avanço do período de rebrota e aumentou com a elevação dos níveis de infestação. Já para os carboidratos não fibrosos no resíduo e nas raízes o nível de infestação não alterou a concentração, no entanto, o período de rebrota influenciou nos CNF, havendo um comportamento quadrático no resíduo variando de 297,6 a 405,6 mg g<sup>-1</sup> e no sistema radicular de 344,4 a 439,6 mg g<sup>-1</sup>.

Em um estudo com aplicação de diferentes doses de fertilizante (controle, recomendado e metade do recomendado) em *Brachiaria ruziziensis* infestada com ninfas e adultos de *Mahanarva spectabilis*, Aguiar et al. (2014) observaram que a adubação promoveu uma maior sobrevivência da ninfa, todavia, reduziu o dano causado pelas ninfas e pelos adultos, não alterando a qualidade da gramínea, uma vez que a fertilização não promoveu efeitos significantes sobre a celulose, lignina, PB, FDN e FDA. Além disso, no tratamento aplicando a dose recomendada houve recuperação da forragem, mesmo quando exposto a 5 ninfas ou 10 adultos.

Realizando estudos de correlações entre a densidade de insetos herbívoros (brocas, pulgões e cigarrinhas) e os fatores bioquímicos das flores e frutos em genótipos de berinjela (Shamli hybrid, Pearl Long e Black beauty), Khan et al. (2015) identificaram que teor de fibra e o açúcar total não apresentaram efeito significativo. Nos genótipos Shamli hybrid e Pearl Long há uma correlação positiva e significativa da umidade e proteínas com toda a população de insetos e uma correlação negativa com os teores de cinza e gordura. Sabe-se que o maior conteúdo de cinzas possui ação deterrente, logo, o maior teor de cinzas do genótipo Pearl Long (11,84%) correlacionou-se mais negativamente com os insetos.

Avaliando a correlação entre composição química e a densidade de insetos (besouro-saltador, mosca-dos-brotos, gafanhoto, lagarta do cartucho, besouro da folha e besouro da folha de abóbora) em sete cultivares de milho (Azam, Jalal, Babar, Pahari, Iqbal, Climax 3055 e Climax 0M62) Shah et al. (2016), constataram que os teores mínimos de umidade, proteínas e maior teor de MM (material mineral) contribuem para o aumento da resistência das cultivares ao ataque dos insetos. Nas demais variáveis não houve significância, a FB (fibra bruta) correlacionou-se negativamente com as densidades de insetos, os carboidratos positivamente e a gordura correlacionou-se negativamente com o besouro saltador e a lagarta do cartucho e positivamente com os demais insetos.

Determinando o conteúdo de aminoácidos livres e de proteínas, Falcão et al. (2013). observaram que estes apresentaram o mesmo comportamento para o genótipo resistente de palma ao *D. opuntiae*, com elevação no período de 50% de infestação e queda aos 100%. Na palma com resistência intermediária há uma queda do conteúdo de aminoácidos livres ao longo da infestação e um aumento no teor de proteína solúvel na susceptível. Os autores ainda relatam que há um comportamento antagônico entre aminoácidos e proteína onde aos 100% de infestação há uma queda na proteína e elevação de aminoácidos livres que pode ser um indicativo de catabolismo para disponibilizar aminoácidos para outras rotas como as do metabolismo secundário, com o intuito de combater a ação do inseto, uma vez que os aminoácidos são precursores de metabólitos relacionados à defesa vegetal como os alcaloides e aleloquímicos.

O conteúdo de ácidos orgânicos em genótipos susceptíveis de palma forrageiras do gênero *Opuntia* passou de 33 para 56  $\mu\text{Eg g}^{-1}$  MS quando a infestação da área do cladódio

foi de 100% e nas demais ocorreu uma redução, na de resistência intermediária de 45 para 34  $\mu\text{Eg g}^{-1}$  MS e na resistente de 62 para 58  $\mu\text{Eg g}^{-1}$  MS (Falcão et al., 2013).

Uma das saídas utilizadas frente às pragas e doenças, sem a utilização de agroquímicos, é através do melhoramento genético, selecionando cultivares resistente ou introduzindo genes que codifiquem compostos de resistência sem que haja perdas do valor nutricional, uma vez que esta prática não provoca danos ao meio ambiente. Sendo assim, torna-se necessário o aprofundamento no estudo dos recursos genéticos, morfoanatômicos, fisiológicos e bioquímicos destas plantas, correlacionando com maiores produções e produtividades, tolerância à seca, além de resistência as diversas pragas.

## **1.7 - CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As plantas apresentam diversos mecanismos físicos, morfológicos e químicos de defesa contra os insetos herbívoros, os quais poderiam ser otimizados, estimulando a expressão desses mecanismos, minimizando o uso de inseticidas. As interações entre insetos e plantas são complexas e dinâmicas, pois tanto o inseto como a planta pode mudar ao longo do tempo. A resistência das plantas a insetos é um fenômeno relativo e altamente variável, influenciada por vários fatores de interação envolvendo a planta, o inseto e o ambiente.

Os estudos avaliando os impactos no valor nutritivo de plantas forrageiras infestadas por inseto ainda são escassos, principalmente em palma forrageira. Embora haja trabalhos que apresentem a composição química desta forrageira.

Ainda há muito a ser entendido sobre a base genética da adaptação da planta hospedeira, sendo necessários estudos de perfis de expressão gênica na reação inseto-planta, os quais ajudarão na compreensão dos mecanismos específicos dessa relação sobre a integração metabólica, identificando genótipos resistentes e de resistência intermediária com características que possam ser incorporadas através de melhoramento genético em genótipos comerciais. Além disso, a utilização de genótipos que apresentam resistência no

contexto do manejo integrado de pragas é uma alternativa viável e de menor impacto no meio ambiente, devido à redução de agroquímicos.

### 1.8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, D. D. M.; Auad, A. M.; Fonseca, M. D. G.; Leite, M. V. 2014. *Brachiaria ruziziensis* responses to different fertilization doses and to the attack of *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) nymphs and adults. The Scientific World Journal 2014:1-8.
- Aoyama, E. M.; Labinas, A. M. 2012. Características estruturais das plantas contra a herbivoria por insetos. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer 8:366-386.
- Arruda, E. C. P.; Melo-de-Pinna, G. F. de A. 2015. Caracteres anatômicos do segmento caulinar em espécies da subfamília Opuntioideae (Cactaceae). Hoehnea 42(2): 195-205.
- Arruda, E.C.P; Melo-de-Pinna, G.F., 2010. Wide-band tracheids in the photosynthetic and non-photosynthetic stem in species of Cactaceae. Journal of the Torrey Botanical Society 137:16-19.
- Boiça Júnior, A. L.; Souza, B. H. S.; Lopes, G. S.; Costa, E. N.; Moraes, R. F. O.; Eduardo, W. I. 2013. Atualidades em resistência de plantas a insetos. p. 207-224 In: Busoli, A. C.; Alencar, J. R. D. C. C.; Fraga, D. F.; Souza, L. A.; Souza, B. H. S.; Grigolli, J. F. J. (Eds.). Tópicos em entomologia agrícola – VI. Jaboticabal: Gráfica Multipress.
- Bruce, T.J.A. 2015. Interplay between insects and plants—dynamic and complex interactions that have coevolved over millions of years but act in milliseconds. J Exp Bot 66:455–465.
- Congio, G. D. S.; Corsi, M.; de Almeida, P. C.; Goulart, R. C. D.; Passos, L. P.; Köpp, M. M. 2012. Rebrotas do capim-marandu submetido ao ataque de cigarrinhas. Arquivos do Instituto Biológico 79(3):389-396.
- Falcão, H.M; Oliveira, M.T.; Mergulhão, A.C.; Silva, M.V.; Santos, M.G. 2013. Ecophysiological performance of three *Opuntia ficus-indica* cultivars exposed to carmine cochineal under field conditions. Sci Hort 150:419–424.

- Fortes, P. Desenvolvimento de uma dieta artificial para a criação de *Nezara viridula* (L.,1758) e *Euschistus heros* (F., 1798) e sua relação com *Trissolcus basal* (Wollaston, 1858). 2005. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de Concentração: Entomologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Fürstenberg-Hägg, J.; Zagrobelny, M.; Bak, S. 2013. Plant Defense against Insect Herbivores. *Int. J. Mol. Sci.* 14:10242-10297.
- Gomes, J. B. 2011. Adubação orgânica na produção de palma forrageira (*Opuntia fícus-indica* (L) Mill.) no cariri paraibano. Dissertação (M.Sc.). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.
- Guevara-Figueroa, T.; Jiménez-Islas, H.; Reyes-Escogido, M.; Mortensen, A.G.; Laursen, B.B.; Lin, L-W.; León-Rodríguez, A. de.; Fomsgaard, I.S.; Rosa, A.P.B. de L. 2010. Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp.). *Journal of Food Composition and Analysis* 23:525-532.
- Gullan, P. J.; Cranston, P. S. 2007. Os insetos: um resumo de entomologia. 3 ed. São Paulo, Rocca, 440p.
- Kant, M.R., Jonckheere, W., Knecht, B. et al. 2015. Mechanisms and ecological consequences of plant defence induction and suppression in herbivore communities. *Ann. Bot.* 115:1015–1051.
- Khan, I. A.; Habib, K.; Akbar, R.; Khan, A.; Saeed, M.; Farid, A.; Alam, M. 2015. Proximate chemical composition of brinjal, *Solanum melongena* L. (Solanales: Solanaceae), genotypes and its correlation with the natural enemies in Peshawar. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 3(5): 07-11.
- Lara, F. M. Princípios de resistência de plantas a insetos. 2. ed. São Paulo: Ícone, 1991. 336 p.
- Lenzi, M.; Soares, J.; Orth, A.F. 2006. Predação de *Opuntia monacantha* (Willd.) Haw. (Cactaceae) por *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae) em restingas da Ilha de Santa Catarina, sul do Brasil. *Biotemas* 19:35–44.

- Lima, G. F. C., Silva, J. G. M., Nobre, F. V., Barreto, H. F. M. 2009. Produção estratégica de alimentos para a pecuária familiar no semiárido: Alternativas para a formulação de rações na própria fazenda. EMPARN, Natal.
- Llanderal C. C.; Campos, F. M. 2001. Sistemas de producción de la grana cochinilla, p: 61-67. In Llanderal C. and R. Nieto H. [eds.], Producción de Grana Cochinilla. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México, México.
- Lopes, E. B. et al. 2010. Seleção de genótipos de palma forrageira (*Opuntia* spp.) e (*Nopalea* spp.) resistentes à cochonilha-do-carmim (*Dactylopius opuntiae* Cockerell, 1929) na Paraíba, Brasil. Engenharia Ambiental - Pesquisa e Tecnologia, Espírito Santo do Pinhal 7(1):204-215.
- Lopes, E.B.; Albuquerque, I.C.; Brito, C.H, et al. 2009. Velocidade de Infestação de *Dactylopius opuntia* Cockerell, 1896 em Palma Gigante na Paraíba. Engenharia Ambiental 6:196-205.
- Moura, J. G. 2012. Valor nutritivo e características anatômicas de variedades de palma forrageira (*Nopalea* sp. e *Opuntia* sp.) com diferentes níveis de resistência à cochonilha do carmim (*Dactylopius opuntiae* Cockerell). Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- Msaddak, L.; Abdelhedi, O.; Kridene, A.; Rateb, M.; Belbahri, L.; Ammar, E.; Nasri, M.; Zouari, N. 2017. *Opuntia ficus-indica* cladodes as a functional ingredient: bioactive compounds profile and their effect on antioxidant quality of bread. Lipids Health Dis 16: 32.
- Noronha, C. T. 2017. Padrão morfo-anatômico de variedades de palma forrageira dos gêneros *Opuntia* e *Nopalea* cultivadas no Semiárido brasileiro. Mestrado: Ciência Animal e Pastagens - Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, Garanhuns.
- Panis, D.N.; Padró, J.; Furió-Tarí, P.; Tarazona, S.; Milla Carmona, P.S.; Soto, I.M.; Dopazo, H.; Conesa, A.; Hasson, E. 2016. Transcriptome modulation during host shift is driven by secondary metabolites in desert *Drosophila*. Mol Ecol. 25(18):4534-50.

- Pérez-Ramírez, A.; Castrejón-Ayala, F.; Jiménez-Pérez, A. 2014. Potential of terpenoids and mealybug extract to deter the establishment of *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae) crawlers on *Opuntia ficus-indica*. Florida Entomologist 97(1):269-271.
- Pritchard, J.; Griffiths, B.; Hunt, E.J. 2007. Can the plant-mediated impacts on aphids of elevated CO<sub>2</sub> and drought be predicted. Glob Chang Biol 13:1616–1629.
- Rodrigo, E., Catalá-Oltra, M. Y., Granero, M. 2010. Estudio comparativo de la morfología y biología de *Dactylopius coccus* Costa y *D. opuntiae* (Cockerell) (Hemimptera: Dactylopiidae), dos especies presentes en la Comunidad Valenciana. Boletín de Sanidad Vegetal 36:23-35.
- Saleem, M.; Kim, H.J.; Han, C.K.; Jin, C.; Lee, Y.S. 2006. Secondary metabolites from *Opuntia ficus-indica* var. Saboten. Phytochemistry 67:1390-1394.
- Santana, G.M.S., Albuquerque, L.P., Simões, D.A., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G. Gusmão, N.B. 2009. Isolation of lectin from *Opuntia ficus-indica* cladodes. Acta Hort. (ISHS) 811:281-286.
- Shah, B.; Khan, I. A.; Khan, A.; Din, M. M. U. 2016. Correlation between proximate chemical composition and insect pests of maize cultivars in Peshawar. Journal of Entomology and Zoology Studies 4(1):312-316.
- Silva, M. G. S.; Dubeux Júnior, J. C. B.; Assis, L. C. S. L. C. et al. 2010. Anatomy of different forage cacti with contrasting insect resistance. Journal of Arid Environments 74:118-122.
- Span, T. M.; Schumann, A. W. Mineral nutrition contributes to plant disease and pest resistance. University of Florida document HS1181, 2010. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu>>. Acesso em: 30 de abril 2017.
- Taiz, L.; Zeiger, E. 2013. Metabólitos Secundários e Defesa Vegetal. p.369-400. In: Fisiologia Vegetal. TAIZ, L.; ZEIGER, E. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 954p.
- Van Dam, A. R., May, B. 2012. A new species of *Dactylopius* Costa (*Dactylopius gracilipilus* sp. nov.) (Hemiptera: Coccoidea: Dactylopiidae) from the Chihuahuan Desert, Texas, U.S.A. Zootaxa 3573:33–39.



- Vasconcelos, A. G. V., Lira, M. A., Cavalcanti, V. L. B., Santos, M. V. F., Willadino, L. 2009. Seleção de clones de palma forrageira resistentes à cochonilha-do-carmim (*Dactylopius* sp.). Revista Brasileira de Zootecnia 38:827-831.
- Will, T.; Furch, A.C.U.; Zimmermann, M.R. 2013. How phloem-feeding insects face the challenge of phloem-located defenses. Frontiers in Plant Science 4: 1–12.
- Wright, C.R.; Setzer, W. N. 2014. Characterization of volatiles of necrotic *Stenocereus thurberi* and *Opuntia littoralis* and toxicity and olfactory preference of *Drosophila melanogaster*, *D. mojavensis wrigleyi*, and *D. mojavensis sonorensis* to necrotic cactus volatiles. Nat Prod Commun. 9(8):1185-92.
- Zimmermann, H. G. & G. Granata. 2002. Insects pests and diseases, p. 235-254. In: P. S. Nobel (Ed.). Cacti: Biology and Uses. Ed. University California Press. California, USA.

## CAPÍTULO II

---

**Valor nutricional de genótipos de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*)  
infestados com *Dactylopius opuntiae***

**Valor nutricional de genótipos de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) infestados com *Dactylopius opuntiae***

**RESUMO**

Objetivou-se avaliar a influência da interação inseto-planta sobre o valor nutricional de genótipos de palma forrageira com diferentes graus de resistência ao *Dactylopius opuntiae*. Foram avaliados quatro genótipos de palma forrageira do gênero *Opuntia* (IPA-100003, IPA-200008, IPA-200016 e IPA -200149) e três do gênero *Nopalea* (IPA-100004, IPA-200021 e IPA -200205), com delineamento experimental inteiramente casualizado e esquema fatorial 7 x 7, que correspondem a 7 genótipos e 7 períodos de coleta (0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de infestação com o *Dactylopius opuntiae*), com 5 repetições para a contagem dos insetos e 3 para as análises laboratoriais. Foram realizadas a contagem de colônias e as análises químico-bromatológicas, digestibilidade, degradabilidade e produção de gases *in vitro*. Para a infestação e dispersão do *Dactylopius opuntiae*, houve efeito de interação ( $P < 0,05$ ) entre os dias de infestação e os genótipos estudados. Nas características químico-bromatológicas observou-se interação ( $P < 0,05$ ) entre genótipos e os dias após a infestação em todas as variáveis, com diferenças entre os genótipos e entre os dias ( $P < 0,05$ ), exceto nas variáveis B2 (fibra digerível), EE (extrato etéreo), PB (proteína bruta), NDT (nutrientes digestíveis totais) e CHOT (carboidratos totais) em alguns genótipos. Houve interação ( $P < 0,05$ ) entre genótipos e dias após a infestação em todos os parâmetros de digestibilidade e degradabilidade. Observou-se na variável DIVMS (digestibilidade *in vitro* da matéria seca) significância ( $P < 0,05$ ) entre os genótipos em todos os dias de infestação, assim como para cada genótipo em relação aos dias. Para a variável DEG MS, (degradabilidade da matéria seca) observou-se que não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) dos dias 0 aos 45 dias e nos genótipos IPA-100003, IPA-100004 e IPA-200205. Todos os genótipos do gênero *Opuntia* reduziram a produção total de gases ao longo do estudo. O IPA-200008 reduziu sua produção desde o início da infestação (6,96 mL g<sup>-1</sup> MS a cada 15 dias), o IPA-100003 e o IPA-200016 a partir dos 15 dias após a infestação (2,69 e 3,51 mL g<sup>-1</sup> MS a cada 15 dias, respectivamente) e na IPA-200149 houve elevação da

produção aos 15 e 45 dias e um acentuado declínio após os 45 dias, com redução da produção de 12,89 mL g<sup>-1</sup> MS a cada 15 dias. Os dias de infestação pouco alteraram o valor nutricional. As frações de MM (matéria mineral), CNF (carboidratos não fibrosos) e A+B1 do fracionamento dos carboidratos são alteradas pela interação da palma com a cochonilha do carmim, podendo indicar o impacto dessa interação. Frações como PB, FDN (fibra em detergente neutro), C dos carboidratos e a DEG MS podem ser utilizadas para explicar os efeitos dessa interação. A pressão de infestação reduziu a produção total de gases em todos os genótipos do gênero *Opuntia*, principalmente no IPA-100003 e IPA-200008, nos quais também foram constatados as maiores quedas de produção de CNF. Nos do gênero *Nopalea* a pressão de infestação influenciou a produção total de gases no IPA-200021, principalmente entre 15 e 60 dias de infestação.

**Palavras-chaves:** bromatologia, cactáceas, digestibilidade, interação, inseto-praga, nutrição de ruminantes, Semiárido

**Nutritional value of cactus pear genotypes (*Opuntia* and *Nopalea*) infested with  
*Dactylopius opuntiae***

**ABSTRACT**

The objective of this work was to evaluate the influence of the insect-plant interaction on the nutritional value of different types of resistance to *Dactylopius opuntiae*. Four genotypes of cactus pear of the genus *Opuntia* (IPA-100003, IPA-200008, IPA-200016 and IPA -200149) and three genotypes of the genus *Nopalea* (IPA-100004, IPA-200021 and IPA -200205) were evaluated a completely randomized experimental design and 7 x 7 factorial design, corresponding to 7 genotypes and 7 collection periods (0, 15, 30, 45, 60, 75 and 90 days of infestation with *Dactylopius opuntiae*), with 5 replications for counting of the insects and 3 for the laboratory analyzes. The colonies were counted and performed as chemical-bromatological analysis, digestibility, degradability and *in vitro* gas production. For the infestation, there was an interaction effect (P<0.05) between the days of

infestation and the studied genotypes, which were deployed. In the chemical-bromatological characteristics, interaction ( $P < 0.05$ ) between genotypes and days after an infestation was observed in all variables, with between genders and between days ( $P < 0.05$ ), except for the variables B2 (digestible fiber), EE (ethereal extract), PB (crude protein), NDT (total digestive nutrients) and CHOT (total carbohydrates) in some genotypes. There was interaction ( $P < 0.05$ ) between genotypes and days after an infestation in all parameters of digestibility and degradability. Significance ( $P < 0.05$ ) was observed in the variable IVDMD (*in vitro* dry matter digestibility) between the genotypes on all days of infestation, as well as for each genus in relation to the days. For a variable DEG MS (dry matter degradability) it was observed that there is not a great difference ( $P > 0.05$ ) from days 0 to 45 days and in genotypes IPA-100003, IPA-100004 and IPA-200205. All genotypes of the genus *Opuntia* reduced total gas production throughout the study. The IPA-200008 reduced its production from the beginning of the infestation ( $6.96 \text{ mL g}^{-1} \text{ MS}$  every 15 days), the IPA-100003 and the IPA-200016 from 15 days after an infestation ( $2.69$  and  $3.51 \text{ mL g}^{-1} \text{ MS}$  every 15 days, respectively) and in IPA-200149 there was an increase in production at 15 and 45 days and a marked decline after 45 days, with a reduction in the production of  $12.89 \text{ mL g}^{-1} \text{ MS}$  at each 15 days. The days of infestation did little to change the nutritional value. As the fractions of MM (mineral matter), CNF (non-fibrous carbohydrates) and A + B1 of carbohydrate fractionation are altered by the interaction of the palm with the carmine cochineal, indicating the impact of the interaction. Fractions such as PB, NDF (neutral detergent fiber), C of carbohydrates and DEG MS can be used to explain the cases of this interaction. A reduced infestation pressure to total gas production in all genotypes of the genus *Opuntia*, mainly not IPA-100003 and IPA-200008, are also presented as the largest decreases in CNF production. In the *Nopalea* genus an infestation pressure influenced a total production of non-IPA-200021 gases between 15 and 60 days of infestation.

**Keywords:** bromatology, cactaceae, digestibility, interaction, insect-pest, ruminant nutrition, Semiarid

## 2.1 - INTRODUÇÃO

O Nordeste é a segunda região política mais populosa do Brasil, com mais de 57 milhões de habitantes (IBGE, 2015), com predominância do clima semiárido. A região possui elevadas temperaturas diurnas e, em alguns locais, baixas temperaturas noturnas, alta radiação solar, baixa umidade do ar e baixa precipitação pluvial. A pecuária tem sido um dos principais setores primário da economia, com criações de bovinos, ovinos e caprinos, em um importante recurso forrageiro que é o pasto nativo (Andrade et al., 2006; Dubeux Júnior et al., 2013).

Em virtude dos padrões irregulares de distribuição de chuvas, bem como dos baixos índices pluviais, com concentrações em três a quatro meses dentro da estação chuvosa e com médias entre 300-800 mm, há um balanço hídrico negativo e, conseqüentemente, a produção de forragem e a disponibilidade de nutrientes é comprometida, na qual a produtividade animal fica vulnerável, refletindo-se em baixo desempenho zootécnico (Embrapa, 2011). Associados a estocasticidade das chuvas ao longo do ano, na região Semiárida nordestina, são comuns intensos ciclos de seca. Desta forma, a estacionalidade da produção e qualidade de forragem é um dos grandes gargalos da cadeia produtiva animal, no qual a produção de volumosos em quantidade e qualidade deveria ser prioritária, necessitando planejar adequadamente o suporte de forragens, para garantir a sustentabilidade da pecuária de pequenos ruminantes e da bovinocultura leiteira.

Dentre as alternativas forrageiras para regiões Semiáridas, destaca-se a palma forrageira, que possui alta eficiência na utilização da água, elevada capacidade produtiva de biomassa, adaptação às condições edafoclimáticas da região em virtude de adaptações morfológicas e fisiológicas, como o metabolismo ácido das crassuláceas (MAC), que permitem seu crescimento e desenvolvimento nas regiões Semiáridas (Farias et al., 2005; Santos et al., 2006). Nas últimas décadas, essa cactácea se tornou a base da alimentação de ruminantes, contribuindo no desenvolvimento da região nordestina. Estima-se que a área destinada à produção de palma no Nordeste seja superior a 550.000 ha, com predominância do gênero *Opuntia* (Gigante, Redonda e IPA 20) (Dubeux Júnior et al., 2013; Silva, Oliveira e Souto, 2015). Nutricionalmente, as principais características da palma forrageira

são alto conteúdo de água, minerais, carboidratos solúveis, vitaminas e alta digestibilidade, baixos teores de proteína bruta (Ferreira et al., 2007) e alta aceitabilidade.

Os palmais predominantes na região nordestina até 2001 eram do gênero *Opuntia*, com destaque para as variedades Gigante, Redonda e IPA-20, as quais foram dizimadas rapidamente pelo inseto cochonilha-do-carmim, o qual possui alta prolificidade e disseminação, comprometendo, a produção de volumes e, consequentemente, a caprinocultura e a bovinocultura (Lopes et al., 2009; Vasconcelos et al., 2009) e provocando grandes prejuízos econômicos.

Este inseto foi introduzido no Brasil com o intuito de produzir o corante carmim, sendo importado o inseto *Dactylopius opuntiae* que embora produza o ácido cármico, este não é de boa qualidade quando comparado ao produzido pelo *Dactylopius coccus* (Lopes et al., 2009). Dentre as 10 espécies desse gênero, a *D. opuntiae* é a que possui ação mais devastadora nos palmais, principalmente no gênero *Opuntia* (Rodrigo et al., 2010; Van Dam e May, 2012). Todavia, embora seja um alimento utilizado cotidianamente, são escassos estudos que comparem o valor nutritivo dos genótipos de palma, principalmente dos melhorados geneticamente para tolerarem as pragas, os quais poderiam maximizar a utilização dos nutrientes, minimizando as perdas econômicas.

Frente a este desafio, a melhor alternativa para se conviver com a cochonilha do carmim é por meio da seleção de genótipos de palma forrageira resistentes, uma vez que esta prática não provoca danos ao meio ambiente. A partir de 1022 acessos presentes no banco de germoplasma do IPA (Instituto Agrônomo de Pernambuco) foram identificados genótipos com diferentes graus de resistência a cochonilha do carmim como IPA200016/Orelha de elefante Mexicana, IPA-200205/IPA-Sertânia e IPA-10004/Miúda como resistentes e os genótipos IPA-200008/F8 e IPA-200021/ F21 como intermediários (Santos et al., 2013). Em estudo conduzido por Vasconcelos et al. (2009) a palma Miúda foi classificada como imune, a Orelha de elefante mexicana altamente resistente e o IPA-20 como susceptível ao ataque da cochonilha do carmim. Todavia, embora hoje em dia existam genótipos mais resistentes ao *Dactylopius opuntiae*, com boa produção de biomassa e bom valor nutricional, ainda são escassos estudos que avaliem a interação da

pressão de infestação no valor nutritivo de plantas forrageiras, os quais poderiam contribuir para o melhoramento genético.

Portanto, objetivou-se avaliar o impacto da infestação do *Dactylopius opuntiae* sobre o valor nutricional de genótipos de palma forrageira.

## **2.2 - MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.2.1 - Local do experimento e material genético**

O experimento foi desenvolvido em estufa de vegetação da Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG/UFRPE), localizada no município de Garanhuns-PE, na mesorregião Agreste e na Microrregião Garanhuns, a uma altitude aproximada de 842 metros e coordenadas geográficas de 08°53'25" S e 36°29'34" W, o clima é do tipo tropical chuvoso com verão seco.

Foram avaliados sete genótipos de palma forrageira do gênero *Opuntia* (IPA-100003 - *Opuntia ficus-indica* Mill, IPA- 200008 - *Opuntia atropes* Rose, IPA- 200149 - *Opuntia larreri* F.A.C. Weber e IPA 200016 - *Opuntia stricta* Haw) e *Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck (IPA-100004, IPA-200021 e IPA -200205). O IPA-100003 é considerado susceptível, os IPA- 200008 e IPA-200021 são considerados de resistência intermediária e os demais resistentes aos *Dactylopius Opuntiae*, conforme descrição de Santos et al. (2013).

Os cladódios para a implantação do estudo foram provenientes do banco de germoplasma do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), localizado no município de Arcoverde-PE. Após a colheita, os cladódios foram armazenados durante uma semana em lugar seco, arejado e ao abrigo do sol, para a cicatrização do corte. Antes do plantio, todos os cladódios foram higienizados com solução de hipoclorito de sódio a 2% e detergente neutro a 20%.

### **2.2.2 – Tratamentos e implantação do estudo**

Foram utilizados os sete genótipos de palma mencionados anteriormente, os quais foram infestados com exemplares *Dactylopius Opuntiae*, realizando-se sete colhetas a cada



15 dias (0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de infestação com o *Dactylopius Opuntiae* com cinco repetições), que ocorreu aos 78 dias após a implantação do experimento, quando cerca de 20% das unidades experimentais estavam infestadas (exceto do tratamento 0 dias).

Os exemplares (cladódio base) foram cultivados em vasos com capacidade de 12 L, sendo cultivados um cladódio de cada genótipo por vaso com cinco repetições, totalizando 245 unidades amostrais. Todos os vasos foram preenchidos com solo franco argilo-arenoso e esterco caprino na proporção 10:1 (v/v) (Tabela 2.1), regados a cada 15 dias com 19 mm de água. A temperatura e umidade dentro da estufa foram monitoradas diariamente durante todo o período experimental com auxílio de um termohigrômetro. Durante a condução do estudo a umidade média foi de 62,52% e a temperatura de 25,66 °C (Figura 2.1).

Após 60 dias de estabelecimento dos cladódios nos vasos, foi realizado o desbaste para uniformização, deixando somente três cladódios primários em cada vaso. Após oito dias, cada vaso foi infestado com exemplares de *Dactylopius opuntiae*. A metodologia utilizada para a colonização e dispersão do *D. opuntiae* foi a infestação a partir de pedaços de cladódios com cerca de 65 colônias (Marin, 1987).

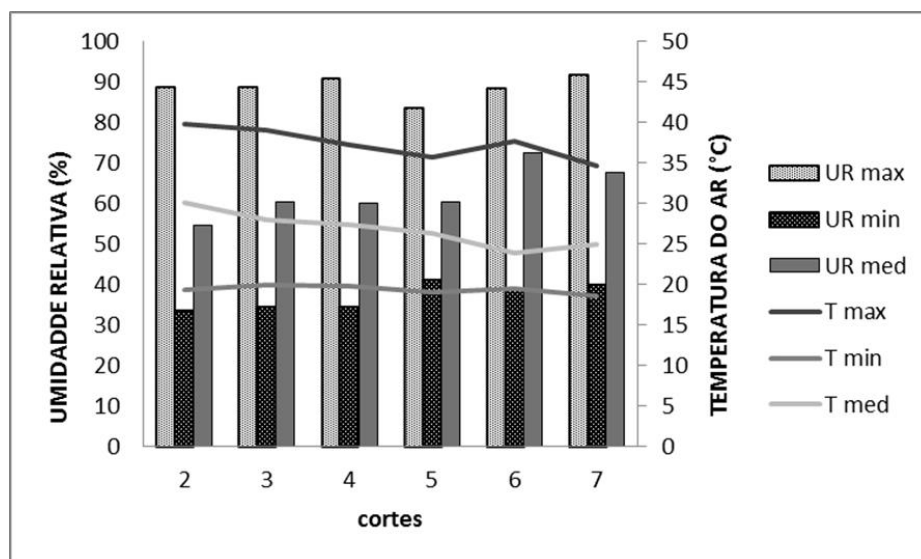
Quando aproximadamente 20% das unidades experimentais foram infestadas (exceto o tratamento 0 dia), o que ocorreu aos 10 dias após a indução da infestação, o tratamento 0 dia foi avaliado e retirado para processamentos. Assim, iniciou-se o experimento propriamente dito, com colheitas quinzenais até os 90 dias após a indução da infestação.

Tabela 2.1-Características químicas e físicas do solo e do composto orgânico utilizados nos vasos

Fertilidade do solo										Física do solo					Composto orgânico				
pH	P	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	H <sup>+</sup> +Al <sup>3+</sup>	Al <sup>3+</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	SB	CTC	MO	Areia	Silte	Argila	Textura	MS	MO	N	P	K
	-----mg dm <sup>-3</sup> -----				-----cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----					g kg <sup>-1</sup>	-----g kg <sup>-1</sup> -----				-----%-----		-----g kg <sup>-1</sup> -----		
5,5	11,94	181,45	0,07	4,70	0,10	0,29	0,43	1,25	5,95	23,98	677	70	253	Franco argilo arenosa	81,25	53,63	25,55	12,78	15,75

P, K, Na: Extrator Mehlich 1, H + Al: Extrator Acetato de Cálcio 0,5 M, pH 7,0, Al, Ca, Mg: Extrator KCl 1 M, SB: Soma de Bases Trocáveis, CTC: Capacidade de Troca Catiônica, M.O.: Matéria Orgânica da fertilidade – Walkley-Black, MO: Método da Mufla (composto), N, P, K Digestão com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Figura 2.1-Dados de temperatura e umidade durante a condução do estudo na estufa de vegetação



### 2.2.3 – Infestação e Dispersão do *Dactylopius opuntiae*

Por meio de contadores de batidas de quatro dígitos (estáticos analógicos), a cada 15 dias, foi avaliado o número de colônias que surgiam no cladódio base e nos três cladódios primários, para se obter o número total de colônias em todas as cinco repetições.

### 2.2.4 – Composição química-bromatológica dos genótipos de palma forrageira infestados com *Dactylopius opuntiae*

As amostras foram pré-secas em estufas de circulação de ar a 45 °C até atingir o peso constante, moídas em peneiras de crivo de 1,0 mm em um moinho de facas tipo Wiley e analisadas de acordo com AOAC (1990) para a determinação da matéria seca (MS) (ID 930,15), matéria orgânica (MO) (ID 942,05), matéria mineral (MM) (ID 942,05) e nitrogênio (ID 954,01), sendo a proteína bruta (PB) calculada pelo fator 6,25 x N. O extrato etéreo (EE) foi determinado por extração com éter etílico durante cinco horas em extrator Soxhlet (AOAC, 920.39).

A fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram determinadas segundo metodologia proposta por Van Soest et al. (1991), adaptada por Senger et al. (2007). Para determinação da lignina foi feita a solubilização da celulose com ácido sulfúrico a 72% (LDA), conforme metodologia proposta por Van Soest et al. (1991). Também foram estimadas as frações de celulose (CEL) e hemicelulose (HEM) pelas equações  $CEL = FDA - LIG$  e  $HEM = FDN - FDA$ .

Os carboidratos totais foram estimados pela equação  $CHOT = 100 - (PB + EE + MM)$  descrita por Sniffen et al. (1992). Os carboidratos não fibrosos (CNF) que correspondem às frações A + B1, foram estimados pela equação  $CNF = 100 - (PB + FDN + EE + MM)$ . A fração B2 (fibra digerível) foi obtida pela diferença entre a FDN e a fração C (fibra indigerível). A fração C foi obtida pela FDN não degradável após 288 horas de incubação *in situ*, conforme descrito por Valente et al. (2011).

O NDT foi calculado segundo Weiss et al. (1992), pela equação  $NDT = 0,98*(100 - FDN - MM - PB - EE - 1) + 0,93*PB + 2,25*EE + 0,75*(FDN - LDA)*(-(LDA/FDN)^{0,667}) - 7$ .

### **2.2.5 – Digestibilidade e degradabilidade dos genótipos de palma forrageira infestados com *Dactylopius opuntiae***

Para digestibilidade *in vitro* verdadeira da matéria seca (DIVMS), utilizou-se a metodologia dos dois estágios descrita por Tilley e Terry (1963), com alterações propostas por Holden (1999), a partir de incubação *in vitro* de 1,0 g de amostra seca ao ar, com 80 mL de solução tampão (combinação das soluções A + B com pH 6,8) e 20 mL de líquido ruminal coletado de dois caprinos fistulados no rúmen, filtrado em quatro camadas de gaze, injetando constantemente gás carbônico para manutenção da anaerobiose do meio. Depois de 48 horas de incubação, 2 mL de ácido clorídico (HCl) 6 molar e 2 mL de solução aquosa de pepsina (1:1000) (0,2 de pepsina mL<sup>-1</sup>) foram adicionados em cada frasco e, após o período de 24 horas de incubação, foram realizados os procedimentos de filtragem a vácuo, secagem e pesagem dos resíduos, visando os cálculos de DIVMS.

Para a degradabilidade no tempo de 48 horas, utilizou-se do resíduo final da produção de gases (vide tópico de produção de gases *in vitro*), que após o tempo final de incubação, cessou-se a fermentação com banho de gelo e, posteriormente, foi avaliada a degradabilidade.

### **2.2.6 – Produção de gases dos genótipos de palma forrageira infestados com *Dactylopius opuntiae***

Para produção de gases *in vitro*, foi adicionado 1,0 g de amostra em frascos de vidros (160 mL), nos quais foram adicionados 90 mL de meio de cultura, conforme Theodorou et al. (1994). Na sequência, foram adicionados 10 mL de inóculo ruminal (oriundo de três caprinos fistulados no rúmen). Após colocação dos lacres, os gases gerados no interior de cada frasco foram eliminados e colocados em estufa com temperatura constante de 39°C durante o período de incubação.

A pressão originada dos gases acumulados na parte superior dos frascos foi mensurada utilizando-se de um transdutor de pressão (Datalogger Universal Logger AG100) conectado a uma agulha (0,6 mm). As leituras foram aferidas nos tempos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 24, 30, 36 e 48 horas de incubação. Para estimativa da equação de

regressão entre os dados de pressão e volume, utilizou-se do procedimento PROC REG do SAS (2002). Os dados de pressão (P em psi = pressão por polegada) foram convertidos em volume de gases (V), adotando-se a equação  $V = 5,1612P - 0,3017$ ,  $R^2 = 0,9873$ , elaborado no Laboratório de Produção de Gases (LPG) da Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE (-8° 90' 77" S, -36° 49' 49" O, altitude de 844 metros), a partir de 937 observações.

Os dados da produção cumulativa de gases foram ajustados pelo modelo bicompartimental sugerido por Schofield et al. (1994), utilizando o procedimento PROC NLMIXED do SAS (2002):

$$V_t = \frac{V_{f1}}{1 + e^{[2-4k1(t-\lambda)]}} + \frac{V_{f2}}{1 + e^{[2-4k2(t-\lambda)]}}$$

onde,  $V_t$  é o volume máximo total de gases produzidos;  $V_{f1}$  (mL g<sup>-1</sup>) é o volume máximo de gás para a fração de rápida digestão (CNF);  $V_{f2}$  (mL g<sup>-1</sup>) representa o volume máximo de gás para a fração de lenta digestão (CF);  $k1$  (% h<sup>-1</sup>) equivale à taxa de degradação da fração de rápida digestão (CNF);  $k2$  (% h<sup>-1</sup>) equivale à taxa de degradação da fração de lenta digestão;  $\lambda$  representa a duração dos eventos iniciais (fase de latência) de digestão, comum as duas fases; e o  $t$  (h) é o tempo de fermentação.

### 2.2.7 – Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com o esquema fatorial de 7 x 7 (7 genótipos de palma e 7 épocas de infestação com o *Dactylopius opuntiae*), com três repetições por tratamento. Os dados foram analisados por intermédio do procedimento GLM do SAS (versão 9.1). Foram considerados como efeitos fixos os genótipos de palma (G), a época de infestação (E) e a interação entre os mesmos (G x E) de acordo com o modelo:  $Y_{ij} = \mu + G_i + E_j + GE_{ij} + \varepsilon_{ij}$ . Em que  $Y_{ij}$  = variável dependente mensurável;  $\mu$  = média geral;  $G_i$  = efeito fixo do genótipo i;  $E_j$  = efeito fixo da época de infestação j;  $GE_{ij}$  = efeito fixo da interação entre a Genótipo i e a Época j e  $\varepsilon_{ij}$  = erro aleatório não observável (NID) (0;  $\sigma^2_\varepsilon$ ).

A avaliação de significância foi realizada por meio do teste de Tukey, adotando-se 0,05 como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I.

## 2.3 - RESULTADOS

### 2.3.1 – Infestação e Dispersão do *Dactylopius opuntiae*

Para o número de colônias, houve interação ( $P < 0,05$ ) entre os dias de infestação e os genótipos estudados, os quais foram desdobrados (Tabela 2.2). Observou-se que não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os dias nos genótipos IPA-100004, IPA-200016 e IPA-200205. O genótipo IPA-100003 se destacou dos demais com relação ao crescimento de colônias ( $56,55$  colônias  $\text{dia}^{-1}$ ), iniciou com  $543,59$  colônias e finalizou com  $3.936,44$  colônias aos 60 dias. O IPA-200008 foi o segundo mais infestado ( $28,58$  colônias  $\text{dia}^{-1}$ ), seguida pelo IPA-200021 ( $3$  colônias  $\text{dia}^{-1}$ ). No genótipo IPA-200149 o crescimento de colônias até 30 dias após a infestação foi de  $0,5$  colônias  $\text{dia}^{-1}$ , aumentando para  $483\%$  entre 30 e 45 dias, o que mudou a relação de crescimento diário para  $4,15$  colônias  $\text{dias}^{-1}$ . No IPA-100004 o número médio de colônias foi  $28,34$ , no IPA-200016 de  $55,31$  e no IPA-200205 de  $78,62$  colônias.

Tabela 2.2-Número de colônias de *Dactylopius opuntiae* em palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) em diferentes dias de infestação

DAI	Genótipos							P-valor	EPM
	03	04	08	16	21	149	205		
0	543,59aE	1,65c	341,35abE	0,00c	209,30bcD	15,43cB	4,89c	0,0001	
15	1144,79aD	19,26d	632,26bD	2,58d	315,40cD	28,83dB	22,08d	0,0001	
30	2069,38aC	6,38d	1043,38bC	1,02d	331,04cBCD	30,94dB	30,92d	0,0001	
45	2639,56aB	11,98d	836,50bCD	11,25d	516,60cABC	144,89dAB	24,31d	0,0001	
60	3936,44aA	29,78e	1596,37bB	110,81de	564,33cAB	354,30cdA	129,07de	0,0001	
75	-	92,22c	2690,56aA	214,67c	680,17bA	202,28cAB	155,89c	0,0001	
90	-	37,11d	2464,11aA	46,89d	479,44bABC	331,22bcA	183,22cd	0,0001	
P-valor	0,0001	0,9410	0,0001	0,0752	0,0001	0,0001	0,1331		73,15

DAI = dias após a infestação, EPM = erro padrão médio.

03= IPA-100003, 04= IPA-100004, 08= IPA-200008, 16= IPA-200016, 21= IPA-200021, 149= IPA-200149, 205= IPA-200205

Letras minúsculas iguais nas linhas e maiúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

### 2.3.2 – Composição química-bromatológica dos genótipos de palma forrageira infestados com *Dactylopius opuntiae*

Nas características químico-bromatológicas observou-se interação ( $P < 0,05$ ) entre genótipos e os dias após a infestação em todas as variáveis (Tabelas 2.3, 2.4, 2.5 e 2.6), com diferenças entre os genótipos e entre os dias ( $P < 0,05$ ), exceto na variável B2 ( $P > 0,05$ ) do fracionamento de carboidratos aos 30 dias de infestação (Tabela 2.6), para o EE ( $P > 0,05$ ) nos genótipos IPA-100003, IPA-100004 e IPA-200008 (Tabela 2.3), para a PB ( $P > 0,05$ ) nos genótipos IPA-100003, IPA-200016 e IPA-200205 (Tabela 2.4), para o NDT ( $P > 0,05$ ) nos genótipos IPA-100003, IPA-200008, IPA-200016 e IPA-200205 (Tabela 2.5) e de CHOT ( $P > 0,05$ ) nos genótipos IPA-100003, IPA-200008, IPA-200016 e IPA-200205.

Durante os dias de infestação o genótipo IPA-200205 apresentou alta MS, exceto aos 90 dias, sendo superada pela IPA-100004 (63,86 vs. 70,84 g kg<sup>-1</sup>). Os geótipos IPA-200021 e IPA-200149 foram semelhantes, com baixa MS em todos os dias de infestação. O IPA-200016 foi semelhante ao IPA-200205 em alguns dias de infestação (0, 15, 60, e 90 dias). No genótipo IPA-100003 a MS foi alta inicialmente (90,02 g kg<sup>-1</sup>) e declinou ao final. Para o genótipo IPA-200008 a MS foi similar ao IPA-200021 após 60 dias.

O genótipo IPA-200016 apresentou a maior MO em todos os dias de infestação exceto aos 75 dias. As menores MO foram observados nos genótipos IPA-200008 e IPA-200021. O IPA-100003 apresentou queda (3%) na MO entre 15-30 dias, elevando-se na sequência. No IPA-100004 há uma elevação ao longo dos dias de infestação (1,28 g kg<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>).

O EE dos genótipos IPA-200016, IPA-200021 e IPA-200149 foram semelhantes durante o estudo, exceto aos 75 dias, quando o genótipo IPA-200016 se destacou dos demais (36,66 g kg<sup>-1</sup>). Semelhanças foram observadas entre IPA-100003, IPA-100004, IPA-200008 e IPA-200205. O IPA-200016 apresentou pouca variação no EE ao longo da infestação, assim como IPA-200021 e IPA-200149. No IPA-200205 observou-se aumento ao longo do estudo (0,120 g kg<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>).

Tabela 2.3-Valores de MS, MM, MO e EE de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) infestadas com o inseto *Dactylopius opuntiae*

Variável	DAI	Genótipos							P-valor	EPM
		IPA-100003	IPA-100004	IPA-200008	IPA-200016	IPA-200021	IPA-200149	IPA-200205		
MS g kg <sup>-1</sup> MN	0	90,02aA	72,75cA	83,66bA	89,33aA	61,50dAB	79,22bA	91,28aA	0,0001	
	15	63,69cB	57,45dD	78,57aA	68,92bcB	63,53cA	63,67cB	73,47abB	0,0001	
	30	58,70cB	65,89bBC	66,95bB	67,78bB	65,89bA	65,77bB	76,87aB	0,0001	
	45	60,67bB	60,74bCD	51,94cD	64,62bBC	54,38cC	54,42cC	76,64aB	0,0001	
	60	60,32bcB	69,51aAB	61,85bcBC	68,47aB	56,41cdBC	56,2dC	65,01abC	0,0001	
	75	-	70,82aAB	60,91bC	61,40bC	56,37bcBC	55,38cC	67,45aC	0,0001	
	90	-	70,84aAB	55,10cD	66,90abBC	57,93cBC	53,64cC	63,86bC	0,0001	
	P-valor	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001		0,83
MM g kg <sup>-1</sup> MS	0	210,39dA	295,00aA	270,24bA	172,40eB	251,91cA	253,62cA	208,85dA	0,0001	
	15	185,00dC	245,00aB	232,05bBC	166,03eBC	2015,45cD	171,16eD	189,87dB	0,0001	
	30	209,09cA	229,37abC	224,81bCDE	172,08eB	240,62aAB	186,50dC	185,12dBC	0,0001	
	45	202,96cAB	210,78bcD	229,88aBCD	177,82dAB	222,44abCD	171,31dD	166,58dD	0,0001	
	60	192,52cBC	190,46cdEF	213,87bE	157,59eC	231,46aBC	179,16dCD	184,28cdBC	0,0001	
	75	-	198,65cE	219,36bDE	186,37dA	236,32aB	208,42bcB	174,40eCD	0,0001	
	90	-	180,22cF	238,21aB	155,94eC	211,25bD	190,95cC	168,65dD	0,0001	
	P-valor	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001		2,63
MO g kg <sup>-1</sup> MS	0	789,61bC	705,00eF	729,76dE	827,60aB	748,09cD	746,38cD	791,15bD	0,0001	
	15	815,00bA	755,00eE	767,95dCD	833,97aAB	784,55cA	828,84aA	810,13bC	0,0001	
	30	790,91cC	770,63deD	775,19dABC	827,92aB	759,38eCD	813,50bB	814,88bBC	0,0001	
	45	797,04bBC	789,22bcC	770,12dBCD	822,18aBC	777,56cdAB	829,69aA	833,42aA	0,0001	
	60	807,48cAB	809,54bcAB	786,13dA	842,41aA	768,54eBC	820,84bAB	815,72bcBC	0,0001	
	75	-	801,35cB	780,64dAB	813,63bC	769,68eC	791,58cdC	825,60aAB	0,0001	
	90	-	819,78cA	761,79eD	844,06aA	788,75dA	809,05cB	831,35bA	0,0001	
	P-valor	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001		2,63
EE g kg <sup>-1</sup> MS	0	27,83abc	28,00abc	26,00bc	33,60aAB	32,07abAB	30,71abcAB	23,81cC	0,0013	
	15	29,50abc	25,74bc	24,01c	36,13aAB	31,75abAB	31,64abAB	25,94bcBC	0,0001	
	30	30,66ab	25,49b	27,41ab	32,45abB	27,07abAB	30,10aAB	26,79abBC	0,0030	
	45	29,41bc	28,44bc	27,72c	40,57aA	33,31abA	35,19abA	32,04bAB	0,0001	
	60	27,51bc	28,90abc	25,67c	34,82abAB	30,08abcAB	35,38aA	27,53bcABC	0,0003	
	75	-	27,18b	25,41b	35,66aAB	24,95bB	27,14bB	25,92bBC	0,0002	
	90	-	22,93b	22,40b	34,25aAB	27,61abAB	33,03aAB	34,56aA	0,0001	
	P-valor	0,6852	0,1941	0,4646	0,0407	0,0069	0,0130	0,0002		0,41

MS=matéria seca, MN = matéria natural, MM=matéria mineral, MO=matéria orgânica, EE=extrato etéreo, DAI = dias após a infestação, EPM = erro padrão médio. Letras minúsculas iguais nas linhas e maiúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).



Tabela 2.4-Valores de PB, FDN, FDA e LDA de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) infestadas com o inseto *Dactylopius opuntiae*

Variável g kg <sup>-1</sup> MS	DAI	Genótipos							P-valor	EPM
		IPA-100003	IPA-100004	IPA-200008	IPA-200016	IPA-200021	IPA-200149	IPA-200205		
PB	0	73,13c	122,25aA	107,81abBC	88,80bc	113,96aB	79,66cC	87,37bc	0,0001	
	15	79,56b	111,79aAB	111,14aABC	73,41b	121,49aAB	80,84bC	84,37b	0,0001	
	30	85,58b	110,76aAB	101,23abC	84,83b	120,82aAB	87,97bBC	85,17b	0,0001	
	45	68,10d	91,78bcBC	105,82abBC	78,88cd	115,57aB	107,33abAB	74,81cd	0,0001	
	60	72,36c	88,38bcC	126,41aAB	86,68bc	128,36aAB	99,97bABC	79,86bc	0,0001	
	75	-	78,60cC	120,51abABC	90,22c	139,27aA	111,86bA	76,64c	0,0001	
	90	-	87,87cdC	133,17aA	74,50d	122,16abAB	105,15bcAB	77,55d	0,0001	
P-valor		0,1478	0,0001	0,0001	0,1204	0,0183	0,0001	0,5264		1,73
FDN	0	264,29aB	239,32bB	216,23cD	209,53cC	204,17cD	219,82cBC	214,89cD	0,0001	
	15	268,11aB	242,72bB	271,14aB	253,82abB	235,65bC	200,95cC	208,37cD	0,0001	
	30	238,84aC	194,05cC	227,87abCD	220,08abC	231,89abC	221,81abB	218,52bD	0,0001	
	45	309,32aA	232,91deB	287,87bAB	248,08cdB	258,63cB	217,83eBC	304,82abA	0,0001	
	60	302,26aA	292,41abcA	298,77abA	253,13dB	274,02cB	281,63bcA	307,12aA	0,0001	
	75	-	287,64aA	275,67aB	249,89bB	275,36aB	287,19aA	240,05bC	0,0001	
	90	-	239,64cB	237,00cC	274,61bA	328,09aA	279,89bA	283,70bB	0,0001	
P-valor		0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001		2,89
FDA	0	216,74aC	183,05bcC	191,61bD	142,45dD	170,59cC	169,75cD	175,92cC	0,0001	
	15	237,29aAB	177,77cC	192,62bD	177,34cBC	177,29cC	139,57dE	149,09dD	0,0001	
	30	173,41aD	152,24bcD	172,05aE	145,41cD	156,70bcD	161,57abD	161,54abD	0,0001	
	45	229,04aBC	177,05cC	233,83aB	208,63bA	152,77dD	167,07cD	178,83cBC	0,0001	
	60	245,14abA	238,44bcA	253,68aA	165,53cC	226,15cA	244,56abA	203,04dA	0,0001	
	75	-	211,18bB	172,92dE	189,29cB	193,65cB	227,40aB	161,84dD	0,0001	
	90	-	187,47cC	216,50abC	171,85dC	227,20aA	204,58bC	190,47cAB	0,0001	
P-valor		0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001		2,61
LDA	0	29,89aAB	25,68abA	23,08bB	28,29abA	26,44abA	27,91abA	22,99bA	0,0070	
	15	32,89aA	22,75bA	16,33cC	14,10cC	17,00bcB	18,44bcBC	13,05cB	0,0001	
	30	24,02aC	20,00abA	23,05aB	21,00abB	25,30aA	14,79bcCD	9,70cB	0,0001	
	45	15,43bcdD	22,33aA	22,03aBC	16,93abcBC	20,31abAB	10,02dD	11,87cdB	0,0001	
	60	26,00aBC	10,93bB	26,55aAB	21,47aB	20,68aAB	23,23aAB	7,25bB	0,0001	
	75	-	10,97bB	21,91abBC	17,98bBC	22,33abAB	21,77bBC	27,72aA	0,0001	
	90	-	14,64cB	31,24aA	20,53bcC	22,24bB	12,61bcCD	13,19bcB	0,0001	
P-valor		0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,55

MS=matéria seca, PB = proteína bruta, FDN = fibra em detergente neutro, FDA = fibra em detergente ácido, LDA = lignina digerida em ácido, DAI = dias após a infestação, EPM = erro padrão médio. Letras minúsculas iguais nas linhas e maiúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

Tabela 2.5-Valores de HEMI, CEL, CNF e NDT de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) infestadas com o inseto *Dactylopius opuntiae*

Variável g kg <sup>-1</sup> MS	DAI	Genótipos							P-valor	EPM
		IPA-100003	IPA-100004	IPA-200008	IPA-200016	IPA-200021	IPA-200149	IPA-200205		
HEMI	0	47,55abcBC	56,27abAB	24,62cD	67,08aBC	33,58bcC	50,07abB	38,97bcE	0,0001	2,06
	15	30,82bC	64,95aAB	78,52aAB	76,48aBC	58,36aBC	61,38aAB	59,28DE	0,0001	
	30	65,43abAB	41,82bB	55,83abBC	74,67aBC	75,19aB	60,24abAB	57,04abDE	0,0016	
	45	80,28bA	55,85bcAB	54,05cBC	39,45cD	105,87aA	50,75cAB	125,98aA	0,0001	
	60	57,12bAB	53,96bAB	45,08bCD	87,60aAB	47,87bC	37,06bB	104,08aAB	0,0001	
	75	-	76,46bA	102,76aA	60,60bCD	81,71abAB	59,79bAB	78,21bCD	0,0001	
	90	-	52,17cAB	20,50dD	102,76aA	100,902aA	75,31bcA	93,23abBC	0,0001	
P-valor		0,0001	0,0047	0,0001	0,0001	0,0001	0,0011	0,0001		
CEL	0	194,37aC	206,26aA	175,56abCD	120,32cD	144,15bcCD	187,01aBC	147,30bcBC	0,0001	2,91
	15	206,10aBC	150,93bcdCD	176,30abCD	163,24bcBC	160,29bcBCD	121,13dE	136,04cdC	0,0001	
	30	229,25aB	132,23bD	155,28bD	132,05bCD	131,40bD	148,88bDE	138,73bC	0,0011	
	45	220,57aBC	161,66cdCD	199,53abABC	171,92bcB	155,59cdBCD	157,05cdCD	131,99dC	0,0001	
	60	261,31aA	180,59cABC	227,14bA	212,76bcA	205,47bcA	221,33bA	195,80bcA	0,0001	
	75	-	200,21abAB	217,21aAB	171,31bB	171,31bBC	205,63aAB	134,11cC	0,0001	
	90	-	172,83abBC	185,26aBCD	151,32bBCD	179,85abAB	150,30bDE	177,28abAB	0,0032	
P-valor		0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001		
CNF	0	424,36bAB	315,43dF	379,71cB	495,67aA	397,91bcA	416,18bC	465,07aAB	0,0001	4,47
	15	437,85cA	374,74deE	361,65eBC	470,62bABC	395,66dA	515,41aA	491,44abA	0,0001	
	30	435,83cA	440,33bcAB	418,66cA	490,56aAB	380,68eA	469,62abB	484,33aA	0,0011	
	45	390,21cdC	436,09abBC	352,72eBC	454,65aCD	370,04deA	468,34aB	421,75bcdBC	0,0001	
	60	405,34bBC	399,85cDE	335,29cC	467,77aBC	336,09cB	403,86bC	401,20bD	0,0001	
	75	-	407,94bCD	359,04cBC	437,86bD	324,10dB	365,40cD	482,99aA	0,0001	
	90	-	469,34aA	369,22cB	460,71abBC	310,90dB	390,98cCD	435,54bBC	0,0001	
P-valor		0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001		
NDT	0	601,47b	530,13cC	563,47bc	674,43a	587,55bcB	578,85bcC	622,35ab	0,0001	3,83
	15	622,60abc	580,58cBC	593,82bc	684,69a	628,07abcAB	680,79aA	662,07ab	0,0001	
	30	622,28ab	613,94bAB	610,79b	677,19ab	687,48aA	668,73abAB	656,17	0,0020	
	45	622,76bc	627,50abcAB	590,29c	674,88ab	615,86bcB	694,13aA	650,89abc	0,0002	
	60	613,53ab	646,84abAB	587,66b	677,85a	592,71bB	645,69abABC	656,12ab	0,0007	
	75	-	638,27abAB	596,49ab	657,36a	577,73bB	607,09abBC	644,77ab	0,0049	
	90	-	656,54abA	570,71c	675,86a	592,29bcB	650,82abAB	673,73a	0,0001	
P-valor		0,8632	0,0001	0,4627	0,9541	0,0001	0,0001	0,4585		

MS=matéria seca, HEMI = hemicelulose, CEL =celulose, CNF = carboidrato não fibroso e NDT = nutrientes digestíveis totais, DAI = dias após a infestação, EPM = erro padrão médio. Letras minúsculas iguais nas linhas e maiúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 2.6-Frações dos carboidratos da palma forrageira (*Opuntia e Nopalea*) infestadas com o inseto *Dactylopius opuntiae*

Variável	DAI	Genótipos							P-valor	EPM
		IPA-100003	IPA-100004	IPA-200008	IPA-200016	IPA-200021	IPA-200149	IPA-200205		
CHOT <sup>1</sup> g kg <sup>-1</sup> MS	0	688,66ab	554,75dD	595,94cd	705,20a	602,08cdB	636,00bcB	679,96ab	0,0001	
	15	705,95a	617,46cCD	632,79bc	724,44a	631,31cB	716,36aA	699,82ab	0,0001	
	30	674,67abc	634,38cBC	646,53bc	710,65ab	715,96aA	691,43abcAB	702,91ab	0,0014	
	45	699,53ab	669,00abcABC	640,59bc	702,73ab	628,67cB	686,17abcAB	726,57a	0,0003	
	60	707,60a	692,26abAB	634,05bc	720,90a	610,11cB	685,49abAB	708,32a	0,0001	
	75	-	695,58abAB	634,72bc	687,75ab	599,44cB	652,59bcAB	723,04a	0,0001	
	90	-	708,98aA	606,22b	735,32a	638,99bB	670,87abAB	719,24a	0,0001	
	P-valor	0,5713	0,0001	0,2357	0,4475	0,0001	0,0167	0,4154		4,14
A + B1 <sup>2</sup> g kg <sup>-1</sup> CHOT	0	616,22dA	568,60eC	637,14cdA	702,81aA	660,83abcA	654,30bcdB	684,00abA	0,0001	
	15	620,25bcA	606,40cdC	571,55dBC	649,59bBC	626,59bcAB	719,48aA	702,19aA	0,0001	
	30	645,99cA	694,10aA	647,31bcA	690,29aAB	663,53abcA	679,20abcAB	689,04abA	0,0007	
	45	557,83bB	651,85aB	550,55bcd	646,80aC	588,30bBC	682,46aAB	580,46bB	0,0001	
	60	572,81bB	577,58bC	528,75cd	648,87aBC	550,81bcd	589,15bC	566,54bcB	0,0001	
	75	-	586,42bC	565,65bcd	635,90aC	540,51cd	559,70bcC	668,00aA	0,0001	
	90	-	661,98aAB	608,04bcAB	626,51abc	486,53dE	582,82cC	605,57bcB	0,0001	
	P-valor	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001		4,69
B2 <sup>2</sup> g kg <sup>-1</sup> CHOT	0	321,81bBC	393,83aA	305,14bcd	240,36dB	265,68cdE	288,93bcBC	270,60cdC	0,0001	
	15	321,46abBC	334,64abBC	365,75aBC	296,19bA	315,17bcd	241,51cd	248,84cC	0,0001	
	30	293,66C	263,30D	300,78D	272,59AB	280,18DE	278,95CD	266,04C	0,1286	
	45	378,56aA	294,46bcd	401,54aAB	291,75bcA	322,97bcd	248,09cd	370,94aAB	0,0001	
	60	350,17bAB	350,44bAB	419,32aA	275,12cAB	350,62bBC	336,40bA	380,78abA	0,0001	
	75	-	348,48aB	388,12aAB	291,69bA	372,75aAB	347,74aA	278,45bC	0,0001	
	90	-	275,88D	341,29bcd	305,23bcA	408,54aA	333,57bAB	332,49bB	0,0001	
	P-valor	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001		4,20
C <sup>2</sup> g kg <sup>-1</sup> CHOT	0	61,97abB	37,57dC	57,72abcAB	56,83abcBC	73,49aCD	56,77bcd	45,40cdB	0,0001	
	15	58,28aB	58,95aAB	62,70aA	54,22abC	58,24aDE	39,00bE	48,97abAB	0,0005	
	30	60,35aB	42,60bC	51,90abAB	57,65abBC	56,29abE	411,85bDE	44,91abB	0,0011	
	45	63,61bcAB	53,69bcBC	47,91cAB	61,45bcABC	88,73aBC	69,45bBC	48,59cAB	0,0001	
	60	77,02bA	71,99bA	51,92cAB	76,02bA	98,57aAB	74,45bB	52,67cAB	0,0001	
	75	-	65,09cdAB	46,22eB	72,41bcAB	86,74abBC	92,56aA	53,56deAB	0,0001	
	90	-	62,14cdAB	49,67dAB	68,26bcABC	104,93aA	83,61bAB	61,94cdA	0,0001	
	P-valor	0,0065	0,0001	0,0394	0,0002	0,0001	0,0001	0,0336		1,45

MS=matéria seca, CHOT = carboidratos totais, A+B1 = carboidratos não fibrosos, B2 = fração disponível de fibra, C = fração indigestível, DAI = dias após a infestação, EPM = erro padrão médio. Letras minúsculas iguais nas linhas e maiúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Os genótipos IPA-200021 e IPA-200008 foram semelhantes na PB em todos os dias de infestação, os quais foram altos. Em contraste, os genótipos IPA-200205 e IPA-200016, que foram semelhantes, verificou-se as menores PB. A PB no genótipo IPA-100004 foi reduzida ( $0,38 \text{ g kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) à medida que aumentaram os dias de infestação e no genótipo IPA-200149 ocorreu o contrário ( $0,28 \text{ g kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ).

Durante toda a condução do estudo a FDN do IPA-100003 sempre foi elevada, do IPA-200008 foi crescente até os 15 dias, estabilizou em seguida e declinou apenas aos 90 dias, obtendo a menor FDN ( $237,00 \text{ g kg}^{-1}$ ). No IPA-200021 foi baixa até 15 dias, elevou-se aos 30, mas declinado na sequência até os 60 dias. Ao se observar cada genótipo ao longo da infestação, verifica-se que aos 30 dias de infestação os genótipos IPA-100003, IPA-100004, IPA-200008 e IPA-200016 reduziram a FDN, enquanto nos demais foi estável.

Os valores de FDA dos genótipos IPA-100003 e IPA-200008 foram próximos durante a condução o estudo, sendo semelhantes entre 30-60 dias. Os genótipos IPA-200149 e IPA-200205 foram semelhantes até os 45 dias. No IPA-200021 são baixos até 75 dias, com um aumento aos 90 dias e assemelhando-se ao IPA-200008. No IPA-200016 a FDA é baixa, exceto aos 45 dias, quando é mediana ( $208,63 \text{ g kg}^{-1}$ ) e no IPA-100004 oscilam de mediana a baixa, sendo alta somente aos 75 dias ( $211,18 \text{ g kg}^{-1}$ ).

A LDA pouco variou entre os genótipos e em IPA-100004 e IPA-200205 as diferenças são mínimas, com maior predominância à estabilização. No IPA-200021 há também uma estabilidade entre 45-75 dias, com declínio na sequência. Nos IPA-200008 e IPA-200016 observaram-se grandes oscilações ao longo da infestação. No IPA-100003 há um declínio entre 15-45 dias e na IPA-200149 entre 0-45 e 60-90 dias. A hemicelulose pouco variou nos dias 15, 30, 60 e 75 dias.

Pouca variação na celulose foi observada aos 30 e 90 dias de infestação, com o IPA-100003 diferente dos demais aos 30 dias. Na maior parte dos dias de infestação, os IPA-200205 e IPA-200021 foram semelhantes, exceto aos 15 e 75 dias. Os genótipos IPA-200016 e IPA-200021 são semelhantes durante todos os dias de infestação.

Nos genótipos IPA-200016 e IPA-200205 observaram-se semelhanças de CNF nos dias 0, 15, 30 e 90 dias e nos IPA-200149 e IPA-200205 nos dias 15, 30 e 60 dias, ambos

com altas produções. O IPA-200008 apresentou o menor CNF durante toda a condução do estudo, juntamente com o IPA-200021 a partir dos 45 dias. O IPA-100003 passou a ter o menor entre os 15 e 45 dias e o IPA-200149 foi considerado mediano até os 75 dias. Poucas variações de CNF entre os dias de infestação foram observadas nos genótipos IPA-100003 e IPA-200021 e IPA-200008.

Os genótipos IPA-200016, IPA-200149 e IPA-200205 foram semelhantes durante toda a condução do estudo, verificando alto NDT. Ao longo da infestação, o NDT foi crescente no IPA-100004 e pouco variável em IPA-200021 e IPA-200149; nos demais não houve diferenças significativas.

Para os CHOT observou-se que os genótipos IPA-100003, IPA-200016, IPA-200149 e IPA-200205 foram semelhantes, exceto ao zero dia quando o IPA-200149 foi diferente do IPA-200016 e aos 75 dias quando o IPA-200149 foi diferente do IPA-200205. O IPA-200008 e o IPA-200021 foram semelhantes, exceto aos 30 dias. Os CHOT aumentaram com os dias de infestação em IPA-100004; no IPA-200021 verificou-se diferença apenas aos 30 dias e no IPA-200149 entre os dias 0 e 15 com 636 e 716,36 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

Com relação à fração A+B1, observou-se que o IPA-100004 foi maior quando comparado com os demais. No IPA-200016, na maioria dos dias de infestação, foram altos e o IPA-200205 foi similar ao IPA-200016 nos dias 0, 30, 75 e 90 dias. No IPA-200021 foi mediano com relação aos demais até os 45 dias, reduzindo aos 60 (550,81 g kg<sup>-1</sup>). No IPA-200149 são elevados até os 60 dias, reduzindo aos 75 dias e 90 dias (559,70 e 582,82 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente). Os genótipos IPA-100003 e IPA-200008 são semelhantes nos dias 0, 30 e 45 dias.

Nos genótipos IPA-200008 e IPA-100003 diferiram apenas aos 60 dias, nos demais foram semelhantes e tiveram elevados B2. Nos genótipos IPA-100003, IPA-200021, IPA-200149 e IPA-200205 observou-se que o aumento dos dias de infestação proporcionou maior B2, no IPA-200016 houve uma estabilização a partir de 15 dias e em IPA-100004 e IPA-200008 observaram-se maiores diferenças entre os dias.

A fração C foi alta durante toda condução do estudo no IPA-200021. No IPA-100003 também foi elevado e similar ao IPA-200021. No IPA-200008 observou-se pouca

influência dos dias de infestação, havendo diferença significativa apenas entre os dias 15 e 75 dias. Nos demais observou-se uma tendência de elevação da fração C ao longo dos dias de infestação.

### **2.3.3 – Digestibilidade e degradabilidade dos genótipos de palma forrageira infestados com *Dactylopius opuntiae***

Houve interação ( $P < 0,05$ ) entre genótipos e dias após a infestação em todos os parâmetros de digestibilidade e degradabilidade (Tabela 2.7). Observou-se na variável DIVMS significância ( $P < 0,05$ ) entre os genótipos em todos os dias de infestação, assim como para cada genótipo em relação aos dias, refa independentemente dos dias de infestação. Para a variável DEG MS, não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) dos 0 dia aos 45 dias e nos genótipos IPA-100003, IPA-100004 e IPA-200205.

Os genótipos IPA-200008 e IPA-100004 são semelhantes e possuem alta digestibilidade. O IPA-100003, quando comparado aos outros possui baixa digestibilidade aos 0, 15 e 45 dias. A digestibilidade do IPA-200021 foi alta, mas se reduziu aos 90 dias. Exceto aos zero e 15 dias, a digestibilidade do IPA-200149 foi baixa.

Aos 60 dias de infestação, observou-se que os IPA-200021 e IPA-200149 foram os menos degradados (DEG MS). O IPA-200008 reduziu a digestibilidade ao longo dos dias de infestação, o IPA-200016 apresentou estabilidade na maior parte dos dias. O IPA-200021 foi variável até 45 dias e estável após essa data e o IPA-200149 foi estável até 45 dias.

Tabela 2.7-Parâmetros de digestibilidade e degradabilidade *in vitro* da matéria seca

Variável g kg <sup>-1</sup> MS	DAI	Genótipos							P-valor	EPM
		IPA-100003	IPA-100004	IPA-200008	IPA-200016	IPA-200021	IPA-200149	IPA-200205		
DIVMS	0	908,46cdBC	966,71aA	926,79bcAB	908,56cdAB	931,03bAB	909,05cdB	889,78dBC	0,0001	
	15	894,96cC	936,08abB	925,30abAB	916,52bA	939,78aA	941,04aA	917,49bA	0,0001	
	30	931,61abA	948,54aAB	946,03aA	916,25bA	921,46bABC	833,54cE	808,56dD	0,0001	
	45	873,78cD	929,22aBC	928,02aAB	908,30abAB	925,23aABC	885,17cC	891,24bcB	0,0001	
	60	920,00aAB	897,96bD	895,73bC	906,59abAB	914,70abBC	872,62cCD	913,29abA	0,0001	
	75	-	912,45aCD	910,35aAB	889,61bcB	906,24abC	859,14dD	870,02cdC	0,0001	
	90	-	901,46bD	926,38aAB	863,68cdC	849,09dD	791,73eF	879,00cBC	0,0001	
	P-valor	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001		2,96
DEG MS	0	869,50	895,22	862,36AB	878,64A	863,98AB	866,80A	871,02	0,6410	
	15	893,36	881,05	885,55A	885,61A	905,82A	899,97A	869,89	0,5693	
	30	868,19	882,47	886,27A	891,95A	851,28ABC	891,70A	851,21	0,1136	
	45	851,41	865,64	875,87A	891,73A	881,29AB	890,19A	879,78	0,3651	
	60	852,70a	851,31a	857,32aAB	839,76abAB	791,98bcD	753,62cC	861,75a	0,0001	
	75	-	869,07a	777,33cC	817,87abcB	803,88bcCD	807,00bcBC	851,22ab	0,0001	
	90	-	884,23a	813,70cBC	877,05abA	827,46bcBCD	855,34abcAB	881,50ab	0,0004	
	P-valor	0,1839	0,3302	0,0001	0,0004	0,0001	0,0001	0,5348		3,21

MS=matéria seca, DIVMS = digestibilidade *in vitro* da matéria seca, DEG MS = degradabilidade da matéria seca

Letras minúsculas iguais nas linhas e maiúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (P&lt;0,05)

#### 2.3.4 – Produção de gases dos genótipos de palma forrageira infestados com *Dactylopius opuntiae*

Todos dos genótipos do gênero *Opuntia* reduziram a produção total de gases ao longo do estudo (Tabela 2.8). O IPA-200008 reduziu sua produção desde o início da infestação (6,96 mL g<sup>-1</sup> MS a cada 15 dias), o IPA-100003 e o IPA-200016 a partir dos 15 dias após a infestação (2,69 e 3,51 mL g<sup>-1</sup> MS a cada 15 dias, respectivamente) e no IPA-200149 houve aumento da produção aos 15 e 45 dias e acentuado declínio após 45 dias, com redução da produção de 12,89 mL g<sup>-1</sup> MS a cada 15 dias. Na comparação do volume total observado e o volume total encontrado a partir do modelo, observou-se que o IPA-100003 e o IPA-200008 foram os que mais se ajustaram ao modelo.

No IPA-200008 observou-se um antagonismo entre CNF (Vt1) e CF (Vf2). Enquanto os valores de CNF aumentaram aos 15 dias (23,60 mL g<sup>-1</sup> MS), os de CF reduziram (45, 9 mL g<sup>-1</sup> MS), com aumento na sequência sob taxa de 10,92 mL g<sup>-1</sup> MS a cada 15 dias e os CNF reduziram a 14, 15 mL g<sup>-1</sup> MS. No IPA-100003 os CNF aumentaram aos 15 dias e reduziram na sequência e os CF reduziram aos 15 dias. O IPA-200016 e o IPA-200149 apresentaram os maiores conteúdos de CNF em todos os DAI e os menores de CF a partir de 30 dias.

A taxa de degradação dos CNF (k2) foram semelhantes (0,03755 % h<sup>-1</sup>, média), exceto para o IPA-100003 entre 0-15 dias. Já a taxa de degradação dos CF (k1) de todos os genótipos apresentaram características distintas. No IPA-100003 houve aumento desde o zero DAI (0,0828 % h<sup>-1</sup>) e nos demais houve redução da taxa ou estabilidade.

O IPA-200016 obteve o menor tempo de colonização ( $\lambda$ ) durante toda a condução do estudo e o IPA-100003 o maior. Até 45 dias de infestação todos apresentaram elevação no tempo de colonização, os IPA-100003 e IPA-200008 declinam aos 60 dias e os demais aumentam. Após 60 dias, o IPA-200016 se estabilizou, o IPA-200149 cresceu em menor ritmo (0,06 h) e o IPA-200008 cresceu consideravelmente (1,73 h).



Tabela 2.8- Parâmetros de produção de gases *in vitro* de genótipos de palma forrageira do gênero *Opuntia* infestadas com *D. opuntiae*

Tratamento		Parâmetro						
DAI	Genótipo	V <sub>t1</sub>	V <sub>t2</sub>	V <sub>f1</sub>	k <sub>1</sub>	V <sub>f2</sub>	k <sub>2</sub>	λ
0	IPA-100003	239,99±3,44	237,30	109,5	0,1086	127,80	0,0373	3,7237
0	IPA-200008	253,53±1,57	250,10	136,6	0,1167	113,50	0,0388	3,1411
0	IPA-200016	268,53±2,58	262,60	159,3	0,1605	103,30	0,0410	2,5045
0	IPA-200149	252,43±2,77	217,61	167,6	0,1363	50,01	0,0425	4,1972
15	IPA-100003	251,99±4,50	247,89	150,1	0,1123	97,79	0,0401	4,0872
15	IPA-200008	233,00±1,86	227,80	160,2	0,1167	67,60	0,0437	3,5049
15	IPA-200016	273,41±5,38	266,63	177,7	0,1516	88,93	0,0415	3,1486
15	IPA-200149	273,97±2,89	267,72	170,3	0,1340	97,42	0,0426	3,1026
30	IPA-100003	246,73±2,80	248,20	127,0	0,1109	121,20	0,0380	4,5338
30	IPA-200008	235,41±6,53	232,20	125,2	0,1016	107,00	0,0381	3,7598
30	IPA-200016	267,77±2,87	263,20	150,3	0,1243	112,90	0,0388	3,1791
30	IPA-200149	249,42±3,55	244,69	158,4	0,1346	86,29	0,0400	3,5991
45	IPA-100003	225,54±10,87	223,50	113,6	0,1021	109,90	0,0365	5,6680
45	IPA-200008	227,97±12,54	225,80	111,5	0,0997	114,30	0,0369	4,6732
45	IPA-200016	255,17±3,54	251,60	143,0	0,1190	108,60	0,0382	3,9522
45	IPA-200149	261,46±4,51	258,43	180,4	0,1349	78,03	0,0397	5,1940
60	IPA-100003	229,23±2,69	225,60	125,1	0,1201	100,50	0,0402	5,2614
60	IPA-100003*	215,52±5,24	211,79	122,4	0,1138	89,39	0,0412	6,1874
60	IPA-200008	219,93±3,37	217,14	120,6	0,0987	96,54	0,0382	3,8848
60	IPA-200016	244,03±6,27	239,97	145,7	0,1264	94,27	0,0400	4,1910
60	IPA-200149	240,39±4,75	239,22	154,9	0,1213	84,32	0,0361	5,3760
75	IPA-200008	215,22±5,90	213,30	113,0	0,0980	100,30	0,0365	5,1818
75	IPA-200016	235,59±7,86	233,74	139,2	0,1248	94,54	0,0389	4,1300
75	IPA-200149	225,03±18,35	222,76	152,8	0,1257	69,96	0,0379	5,0858
90	IPA-200008	211,77±15,66	211,71	89,51	0,0856	122,20	0,0322	5,6311
90	IPA-200016	247,44±0,00	246,86	164,6	0,1448	82,26	0,0429	3,9881
90	IPA-200149	222,79±4,98	221,04	141,9	0,1245	79,14	0,0369	5,4419
EPM		2,01	-	-	-	-	-	-
P-valor		-	-	-	-	-	-	-

DAI = dias após infestação, V<sub>t1</sub> = volume (mLg<sup>-1</sup> MS) total observado, V<sub>t2</sub> = volume (mLg<sup>-1</sup> MS) total encontrado a partir do modelo, V<sub>f1</sub> = volume (mL) de gases produzidos pela degradação da fração A+B1 do Sistema de Cornell (CNF), k<sub>1</sub> = taxa (% h<sup>-1</sup>) específica de produção de gases pela degradação da fração A+B1 (CNF), V<sub>f2</sub> = volume (mL) de gases produzido pela degradação da fração B2 do Sistema de Cornell (CF), k<sub>2</sub> = taxa (% h<sup>-1</sup>) específica de produção de gases pela degradação da fração B2 (CF), λ = latência (h), \* = palma com doenças secundárias.

Nos genótipos do gênero *Nopalea*, a pressão da infestação proporcionou mudanças na produção total de gases no IPA-200021 (Tabela 2.9), que declinou entre os 15 e os 60 dias 86,31 mL g<sup>-1</sup> MS. Nos demais, houve pouca variação da produção total de gases, observando que no IPA-200205 há declínio de 26,29 mL g<sup>-1</sup> MS entre 45 e 60 dias e o IPA-100004 aumentou paulatinamente (3,78 mL g<sup>-1</sup> MS) a cada 15 dias. Na comparação do volume total observado e o volume total encontrado a partir do modelo, observou-se que o IPA-100004 foi o que mais se ajustou ao modelo, seguido pelo IPA-200021.

Tabela 2.9- Parâmetros de produção de gases *in vitro* de genótipos de palma forrageira do gênero *Nopalea* infestadas com *D. opuntiae*

Tratamento		Parâmetro						
DAI	Genótipo	V <sub>t1</sub>	V <sub>t2</sub>	V <sub>f1</sub>	k <sub>1</sub>	V <sub>f2</sub>	k <sub>2</sub>	λ
0	IPA-100004	225,22±2,67	221,48	132,6	0,1123	88,88	0,0385	2,5378
0	IPA-200021	217,41±5,01	214,54	126,5	0,1000	88,04	0,0383	3,4447
0	IPA-200205	271,86±2,54	266,40	163,4	0,1222	103,00	0,0419	3,5145
15	IPA-100004	227,09±3,83	223,49	137,7	0,1094	85,79	0,0405	3,3116
15	IPA-200021	236,69±4,50	236,05	137,4	0,0323	98,65	0,0896	3,4044
15	IPA-200205	274,36±9,03	271,70	134,6	0,1011	137,10	0,0362	3,3936
30	IPA-100004	227,36±10,66	225,40	114,2	0,0988	111,20	0,0354	3,5538
30	IPA-200021	193,30±5,00	188,05	143,4	0,1697	44,65	0,0464	3,4959
30	IPA-200205	264,21±13,40	259,00	155,9	0,1265	103,10	0,0391	3,2925
45	IPA-100004	233,96±11,27	232,00	113,7	0,0950	118,30	0,0348	3,8430
45	IPA-200021	192,60±4,96	188,00	133,2	0,1530	54,80	0,0408	3,8701
45	IPA-200205	268,09±12,16	275,10	166,9	0,1331	108,20	0,0424	4,1610
60	IPA-100004	234,87±5,86	233,50	100,6	0,0922	132,90	0,0345	4,201
60	IPA-200021	150,38±4,41	148,67	73,67	0,1234	75,00	0,0327	3,3775
60	IPA-200205	241,80±8,56	239,40	125,6	0,0989	113,80	0,0365	4,6226
75	IPA-100004	229,76±1,61	227,10	115,7	0,1048	111,40	0,0375	4,7962
75	IPA-200021	175,37±6,43	170,91	118,4	0,1590	52,51	0,0418	3,6656
75	IPA-200205	249,41±7,11	244,98	148,3	0,1243	96,68	0,0411	4,6110
90	IPA-100004	247,90±3,78	246,90	111,1	0,0883	135,80	0,0326	4,1626
90	IPA-200021	189,15±2,38	189,82	76,12	0,0829	113,70	0,0310	6,4896
90	IPA-200205	248,06±6,00	244,90	125,8	0,1043	119,10	0,0372	4,575
EPM		2,01	-	-	-	-	-	-
P-valor			-	-	-	-	-	-

DAI = dias após infestação, V<sub>t1</sub> = volume (mLg<sup>-1</sup> MS) total observado, V<sub>t2</sub> = volume (mLg<sup>-1</sup> MS) total encontrado a partir do modelo, V<sub>f1</sub> = volume (mL) de gases produzidos pela degradação da fração A+B1 do Sistema de Cornell (CNF), k<sub>1</sub> = taxa (% h<sup>-1</sup>) específica de produção de gases pela degradação da fração A+B1 (CNF), V<sub>f2</sub> = volume (mL) de gases produzido pela degradação da fração B2 do Sistema de Cornell (CF), k<sub>2</sub> = taxa (% h<sup>-1</sup>) específica de produção de gases pela degradação da fração B2 (CF), λ = latência (h).

Quanto às taxas de degradação k<sub>1</sub> e k<sub>2</sub>, observou-se no V<sub>f1</sub> que quanto menor foram as taxas de degradação, maiores foram as produções de gases dos carboidratos fibrosos. A taxa de degradação k<sub>1</sub> do IPA-100004, ao logo do estudo reduziu-se em 0,029% h<sup>-1</sup>, o IPA-200205 oscilou ao longo do experimento (0,0179% h<sup>-1</sup>), reduzindo as taxas aos 15, 60 e 90 dias e o IPA-200021 foi o que mais variou, principalmente entre 15-30 dias (0,1533% h<sup>-1</sup>). No V<sub>f2</sub>, as taxas dos genótipos foram semelhantes ao longo do estudo, exceto para o IPA-200021 aos 15 dias, no qual houve uma alta taxa de degradação (0,0896 % h<sup>-1</sup>).

O tempo de colonização aumentou gradativamente no IPA-100004, reduzindo aos 90 dias (0,6336 h). No IPA-200205 o aumento ocorreu entre 30-60 dias (1,3301 h) e

estabilizou-se em seguida. No IPA-200021, houve um crescimento até 45 dias (0,4254 h), declinou aos 60 (0,4926 h) e aumentou em seguida (3,1121 h).

Houve interação ( $P < 0,05$ ) entre genótipos e dias após a infestação em todos os parâmetros de produção total de gases (Tabela 2.10). Observou-se diferença ( $P < 0,05$ ) entre os genótipos em todos os dias de infestação, assim como, para cada genótipo em relação aos dias, exceto para o IPA-100004 ( $P > 0,05$ ). Em todos os dias de infestação, no IPA-200205 foi maior a produção de gases, assim como no IPA-200016 (exceto aos 45 dias) e no IPA-200149 (exceto aos 75 dias e 90 dias). A menor produção de gases em todos os dias de infestação foi observada no IPA-200021. Nos genótipos IPA-100003 e IPA-200021 observou-se pouca variação entre os dias de infestação e nos demais houve uma redução da produção de gases, com estabilização da produção de gases a partir de 60 dias.

Tabela 2.10-Desdobramento e valores médios de produção total de gases (mL g<sup>-1</sup> MS) de genótipos de palma forrageira infestadas com *D. opuntiae*

DAI	Genótipos							P-valor
	IPA-100003	IPA-100004	IPA-200008	IPA-200016	IPA-200021	IPA-200149	IPA-200205	
0	239,99±3,44 <sup>bcAB</sup>	225,22±2,67 <sup>cd</sup>	253,53±1,57 <sup>abA</sup>	268,53±2,58 <sup>aAB</sup>	217,41±5,01 <sup>dA</sup>	252,43±2,77 <sup>abAB</sup>	271,86±2,54 <sup>aA</sup>	0,0001
15	251,99±4,50 <sup>bcA</sup>	227,09±3,83 <sup>d</sup>	233,00±1,86 <sup>cdABC</sup>	273,41±5,38 <sup>abA</sup>	236,69±4,50 <sup>cdA</sup>	273,97±2,89 <sup>abA</sup>	274,36±9,03 <sup>aA</sup>	0,0001
30	246,73±2,80 <sup>abA</sup>	227,36±10,66 <sup>c</sup>	235,41±6,53 <sup>bcAB</sup>	267,77±2,87 <sup>aAB</sup>	193,30±5,00 <sup>dB</sup>	249,42±3,55 <sup>ABa</sup>	264,21±13,40 <sup>aAB</sup>	0,0001
45	225,54±10,87 <sup>dB</sup>	233,96±11,27 <sup>cd</sup>	227,97±12,54 <sup>dB</sup>	255,17±3,54 <sup>bcABC</sup>	192,60±4,96 <sup>eB</sup>	261,46±4,51 <sup>abAB</sup>	268,09±12,16 <sup>aA</sup>	0,0001
60	229,23±2,69 <sup>abcB</sup>	234,87±5,86 <sup>abc</sup>	219,93±3,37 <sup>bcBC</sup>	244,03±6,27 <sup>aC</sup>	150,38±4,41 <sup>dC</sup>	240,39±4,75 <sup>abBC</sup>	241,80±8,56 <sup>abC</sup>	0,0001
75	-	229,76±1,61 <sup>abc</sup>	215,22±5,90 <sup>cBC</sup>	235,59±7,86 <sup>abC</sup>	175,37±6,43 <sup>dB</sup>	225,03±18,35 <sup>bcC</sup>	249,41±7,11 <sup>aBC</sup>	0,0001
90	-	247,90±3,78 <sup>a</sup>	211,77±15,66 <sup>bC</sup>	247,44±0,00 <sup>aBC</sup>	189,15±2,38 <sup>cB</sup>	222,79±4,98 <sup>bC</sup>	248,06±6,00 <sup>aBC</sup>	0,0001
EPM	-	-	-	-	-	-	-	2,01
P-valor	0,0005	0,0561	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	

DAI = dias após infestação

Médias seguidas por mesma letra minúscula nas linhas e por mesma letra maiúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05.

## 2.4 - DISCUSSÃO

O genótipo IPA-100003 foi altamente susceptível, suportando a infestação até 60 DAI, pois doenças secundárias passaram a surgir, o que o fragilizou fisiologicamente e comprometeu a sua recuperação. As defesas das plantas podem ser pré-fabricadas ou produzidas somente após o ataque (Kant et al., 2015). Todavia, o alto número de colônias (Tabela 2.2) tornou evidente o quanto este genótipo foi preferido pelo inseto e que esse não possui barreiras físicas ou químicas que inibam as investidas do inseto.

Os genótipos resistentes (IPA-100004, IPA-200016 e IPA-200205) não diferiram durante os dias de infestação, com exceção do IPA-200149, no número de colônias. Possivelmente, estes genótipos não são preferidos pelos insetos *D. opuntiae* e/ou produzem compostos químicos que afetam negativamente a sua biologia, inibindo o seu crescimento ou a sua reprodução (Boiça Júnior et al., 2015), acreditando-se que possuam estratégias de defesa como as antixenose ou antibiose. Embora no IPA-200149 tenha apresentado maior o número de colônias aos 45 dias, estas não eram desenvolvidas, pois predominavam ninfas I (observações pessoais).

Os genótipos de resistência intermediária (IPA-200008 e IPA-200021) suportaram a pressão de infestação. Conforme Gullan e Cranston (2007), em genótipos com essa resistência não há perdas produtivas significativas, podendo, segundo Boiça Júnior et al. (2015), se recuperar das injúrias. Acredita-se que o IPA-200021 seja mais resistente do que o IPA-200008, pois se observou, em lupa, que houve mortalidade da população de inseto.

A interação inseto-planta e seus impactos no valor nutricional das plantas forrageiras ainda são escassos e dos poucos trabalhos na literatura, observou-se que os teores de cinzas e fibras podem se correlacionar negativamente com a infestação e os flavonóis e o amido pode exercer correlação negativa significativa. Já os açúcares solúveis, as proteínas e a umidade podem atuar como fagoestimulantes, podendo haver correlação positiva e significativa entre proteína bruta, lipídios, teor de umidade, cálcio e redução de açúcar, zinco e magnésio com a densidade dos insetos (Khan et al., 2015; Shah et al., 2016). Contudo, embora a baixa qualidade média de nutrientes na planta possa levar à redução da infestação, a variação dos nutrientes e dos defensivos e não apenas a qualidade

em si pode influenciar na densidade populacional de insetos. Wetzel et al (2016) relataram que o aumento da heterogeneidade de nutrientes nas culturas agrícolas poderia contribuir para o controle sustentável de pragas de insetos.

Observou-se neste estudo que os valores de NDT praticamente não foram alterados e que os aumentos e reduções observados não estão relacionados com o nível de infestação. A redução da MS em todos os genótipos (exceto no IPA-100004) ocorreu devido à proporção do cladódio basal em relação aos três cladódios primários. Inicialmente, a proporção do cladódio basal foi maior e diminuiu com o avançar do experimento. No IPA-100004 a proporção dos três cladódios primários foi maior desde o início, com o decorrer do estudo esses cladódios tiveram o conteúdo de fibra aumentado, o que pode ser visualizado pela FDN (Tabela 2.4). Nota-se que, independentemente do genótipo, o conteúdo de FDN aumentou em todos ao longo dos dias de infestação, o que pode ser atribuído ao crescimento vegetal e não à infestação, assim como na FDA e celulose, os quais não seguiram um padrão específico durante os dias de infestação, ora aumentavam e ora diminuía, não havendo relação com o tempo de infestação.

Os lipídeos podem aumentar com os níveis de infestação devido a depleção de carboidratos (Ahmedani et al., 2009) ou pela formação de  $\beta$ -sitosterol e/ou fitoesterol (Msaddak et al., 2017) os quais podem ter ação deterrente ao *D.opuntiae*. Em estudo conduzido por Khan et al. (2015), verificou-se correlação negativa da proporção de gordura com a população de insetos em alguns genótipos estudados (*Shamli hybrid* e *Pearl Long*). Neste trabalho, as proporções de EE foram estáveis, com poucas alterações nos IPA-200016, IPA-200021 e IPA-200149. No entanto, ressalta-se que o EE possui alta heterogeneidade, podendo ser formados por lipídeos, ceras, fosfatídeos, esteróis, pigmentos, vitaminas lipossolúveis, dentre outros (Detmann et al., 2012). Desta forma, metabólitos secundários de natureza lipídica e a diversidade dos constituintes que formam o EE podem atuar como defesa aos insetos fitófagos sem que haja diferenças significativas no teor de EE, visto que a variação das características dos nutrientes e não a baixa qualidade destes influencia no desempenho dos insetos (Wetzel et al., 2016).

As proteínas aumentaram no IPA-200008 e foram estáveis no IPA-200021, ambas de resistência intermediária e na susceptível foi baixa. Em estudo conduzido por Falcão et

al. (2013) com três genótipos de palma forrageira do gênero *Opuntia*, foi verificado que a redução na proteína e elevação de aminoácidos livres podem ser indicativo de catabolismo para disponibilizar aminoácidos para outras rotas, como as do metabolismo secundário relacionado à defesa vegetal. Possivelmente, os teores de PB proporcionaram produção suficiente de metabólitos para a defesa vegetal, sem que houvesse a necessidade de quebras significativas da proteína nos genótipos intermediários. Já no susceptível, o baixo teor de proteína, associado ao déficit de reservas, impediu que estas fossem mobilizadas para ação de defesa.

A redução da lignina no genótipo susceptível ocorreu a partir dos 30 dias, quando o número de colônias se elevou em 56%. Essa alta pressão de infestação proporcionou o parasitismo de micro-organismos oportunistas, como fungos e bactérias, e deixaram a planta mais debilitada para acionar seus mecanismos de defesa. A redução da lignina nos genótipos se deve à atividade dos micro-organismos em quebrar compostos mais complexos em formas orgânicas mais simples, podendo também ter contribuído para a redução dos CNF, tanto pelo consumo dos micro-organismos como pela planta. Tudo indica que as reservas de CNF foram utilizadas pelo IPA-100003 para agir contra a ação do inseto.

Em todos os genótipos, reduziu-se o MM ao longo do estudo, porém os altos teores de MM observados nos genótipos de resistência intermediária podem ter contribuído como mecanismo de ação contra o *D. opuntiae*. As cinzas possuem propriedades deterrentes que influenciam a biologia e o estabelecimento do inseto, com destaque para os teores de Fe, Cu e Zn, os quais podem induzir a uma maior resistência (Keskin e Ozkaya, 2013; Keskin e Ozkaya, 2015).

Com relação ao fracionamento de carboidratos, as concentrações de CHOT não foram alteradas em função da infestação. Acredita-se que as alterações ocorridas, principalmente no IPA-100004, estão relacionadas ao crescimento da planta. De forma semelhante, as demais frações, A+B1, B2 e C foram alteradas devido ao estado fenológico e às características de cada genótipo. Todavia, ressalta-se que os altos conteúdos de carboidratos não fibrosos (A+B1) nos genótipos resistentes podem contribuir para uma

resposta de defesa contra a ação do inseto de forma mais rápida e, dependendo do perfil dos carboidratos não fibrosos, sem comprometer a produtividade.

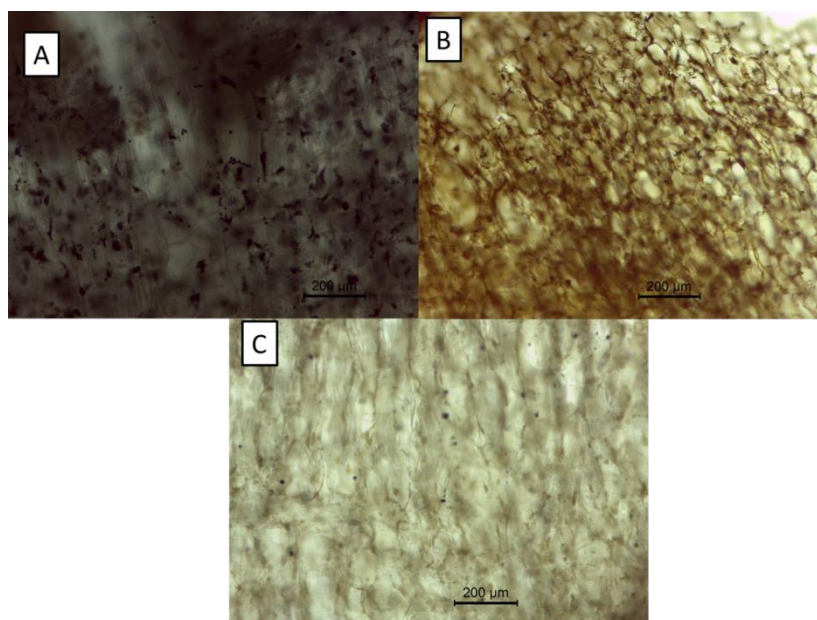
Os baixos valores de A+B1, explicariam a susceptibilidade do IPA-100003 e a resistência intermediária dos genótipos IPA-200008 e IPA-2000021, pois, de acordo Hao et al. (2008), o amido é importante para a planta resistir ou tolerar a infestação durante longo período de tempo e, quando associada a outros mecanismos de defesa como a formação de caloses, a alimentação do inseto é inibida. Sendo assim, no genótipo susceptível, sua morte está associada ao esgotamento das reservas antes de 60 dias de infestação; a competição por nutrientes ao longo da infestação deixou o genótipo debilitado, permitindo condições para a proliferação de micro-organismos oportunistas, causando sua morte aos 60 DAI.

A alta digestibilidade do IPA-200008 se deve à fração B2 e ao baixo conteúdo da fração C dos CHOT. No IPA-100004, sua digestibilidade foi favorecida pelo baixo valor da fração C e dos altos valores de A+B1 e B2. O aumento da digestibilidade do IPA-100003 aos 30 dias ocorreu devido à mobilização dos grânulos de amidos (Figura 2.2), pois conforme Hao et al. (2008), os amidos são hidrolisados em açúcares livres, quando os teores de sacarose são esgotados. Aos 60 dias, o aumento da digestibilidade pode estar relacionado ao surgimento de patógenos oportunistas, como os fungos que realizam a quebra dos compostos mais complexos em formas orgânicas mais simples, para utilizar como substratos, uma vez que a planta já não possuía reservas de amido para atender aos seus requisitos de carboidratos e energia.

A digestibilidade do IPA-200008 foi praticamente estável e a do IPA-200021 foi estável até 45 dias, o que demonstra que a ação dos insetos nesses genótipos pouco altera a digestibilidade, sendo que as alterações na digestibilidade estão mais atreladas ao desenvolvimento vegetativo. Nos demais, os quais são resistentes aos *D. opuntiae*, a redução da digestibilidade está relacionada ao crescimento da planta, pois há redução dos componentes potencialmente digestíveis e o aumento dos constituintes da parede celular.



Figura 2.2-Secção histológica do genótipo IPA-100003 aos 0 (A), 30 (B) e 60(C) dias após a infestação com o *Dactylopius Opuntiae*. Visão dos grãos de amido utilizando o teste de Lugol.



Normalmente, a degradabilidade *in vitro* em palma é considerada alta em virtude dos elevados teores de CNF e pelo baixo teor de lignina. Moura (2012) avaliou a degradação *in situ* (24 e 48 horas) dos tecidos dos genótipos de palma dos gêneros *Nopalea* e *Opuntia*, com diferentes graus de resistência ao *D. Opuntiae* e verificou alta taxa de degradação dos tecidos, restando apenas resíduos da epiderme e da cutícula independente do genótipo e do nível de resistência ao inseto *D. Opuntiae*. Todavia, neste trabalho verificou-se que a partir de 60 DAI os genótipos começaram a se diferenciar, com redução da DEG MS nos genótipos de resistência intermediária (IPA-200008 e IPA-200021), nos quais além do aumento da fração C e dos carboidratos não fibrosos (Tabela 2.6), os minerais podem ter sido utilizados contra o inseto, pois, segundo Shah et al. (2016), os maiores teores de minerais contribuem para o aumento da resistência das plantas ao ataque dos insetos. Observa-se durante a condução do estudo que os minerais são elevados nestes genótipos (Tabela 2.3), assim como a PB (Tabela 2.4), os quais podem ser utilizados para a formação de aminoácidos que fazem parte de rotas ligadas a defesa vegetal.

No gênero *Opuntia* a maior produção de gases foi dos genótipos resistentes IPA-200016 e IPA-200149 (Figuras 2.3 e 2.4). O genótipo IPA-100003 resistiu até 60 dias,

surgindo na maioria dos seus exemplares um estado avançado de necrose, com redução de 13,71 mL g<sup>-1</sup> MS na comparação com os exemplares não necróticos do mesmo genótipo. O tempo de colonização (lag time) está relacionado com a degradação da fração fibrosa. O IPA-200016 apresentou o menor tempo de colonização durante toda a condução do estudo e o IPA-100003 o maior tempo.

No gênero *Nopalea* a pressão da infestação proporcionou mudanças na produção total de gases no IPA-200021 (Tabela 2.9), que declinou entre 15 e 60 dias. Todavia, por se tratar de um genótipo intermediário ao inseto *D. opuntiae*, observou-se que após 60 DAI houve recuperação de 38,77 mL g<sup>-1</sup> MS, com pouca variação nos demais genótipos. A redução da produção total de gases no IPA-200021 dos 15 aos 60 dias ocorreu devido aos carboidratos fibrosos, que entre 15 e 30 dias tem o seu conteúdo reduzido (54 mL g<sup>-1</sup> MS) e entre 30 e 60 dias aos carboidratos não fibrosos, com redução de 69,73 mL g<sup>-1</sup> MS. O aumento da produção total após 60 dias se deve aos CNF dos 60 a 75 dias (44,73 mL g<sup>-1</sup> MS) e dos CF dos 75 a 90 dias (61,19 mL g<sup>-1</sup> MS). No IPA-200205 a variação na produção total de gases se deve a um antagonismo observado entre Vf1 (CNF) e Vf2 (CF), enquanto os CNF foram maiores nos dias 0 e 75, os CF foram menores e aos 15, 60 e 90 dias (Tabela 2.9). No IPA-100004 o antagonismo entre CF e CNF também foi observado ao longo do estudo, havendo entre 15-60 dias aumento dos CF (47,11 mL g<sup>-1</sup> MS) e redução dos CNF (44,73 mL g<sup>-1</sup> MS).

Figura 2.3 -Volume de gases produzidos durante incubação *in vitro* de espécies de palma (*Opuntia* e *Nopalea*) no tempo 0, 15, 30 45, 60, 75 e 90 dias após infestação.

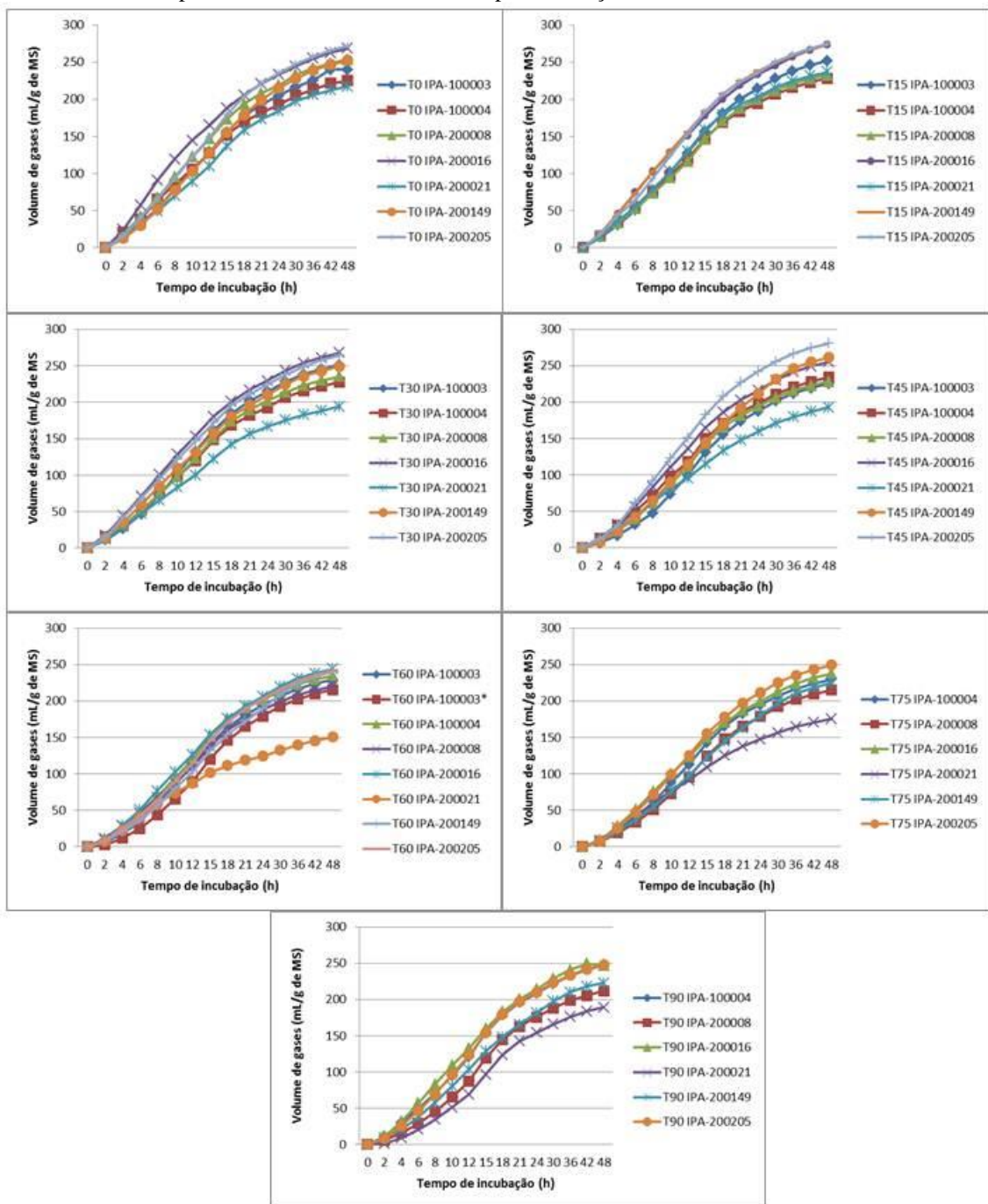
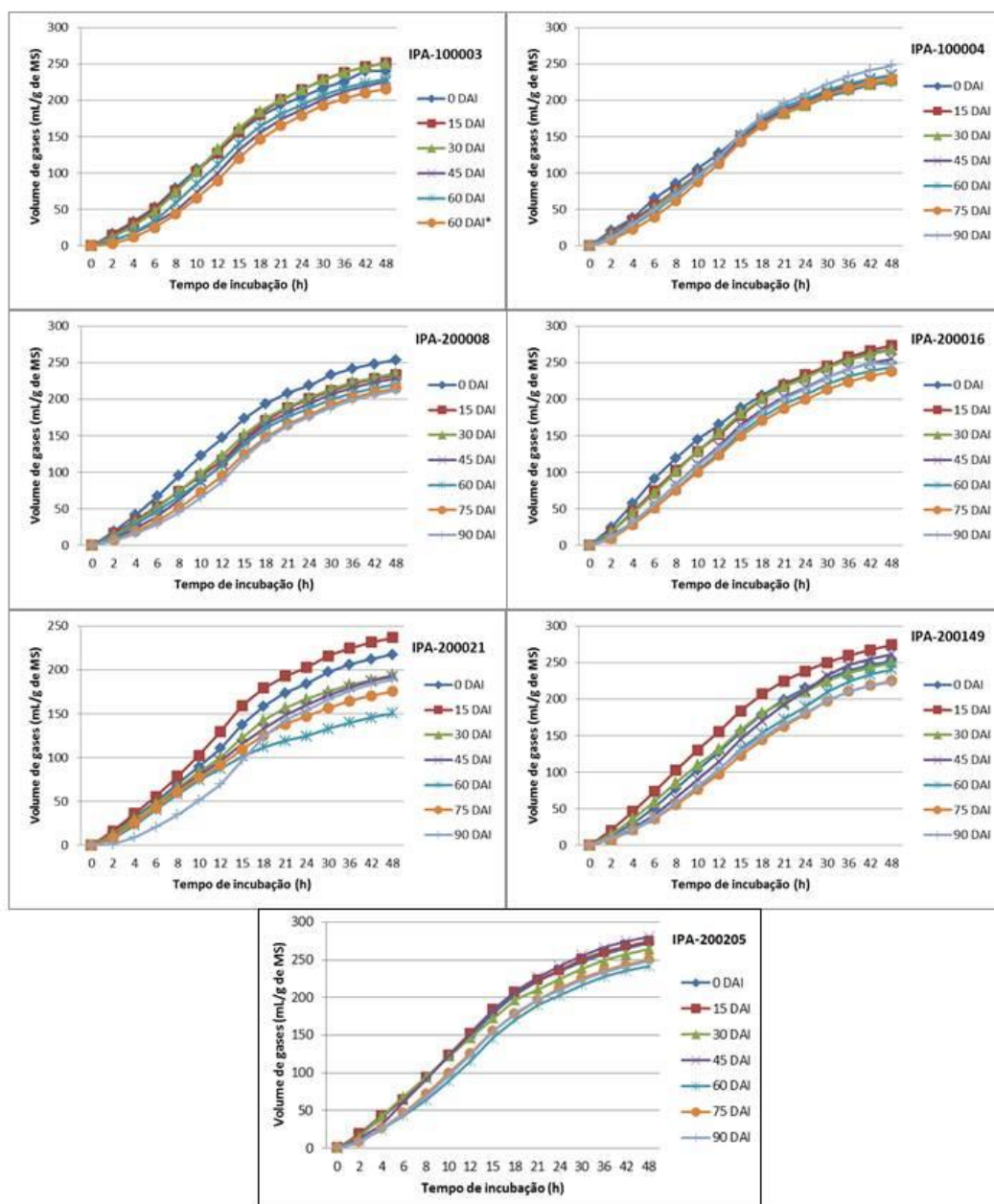


Figura 2.4-Volume de gases produzidos durante incubação in vitro no tempo 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias após infestação em espécies de palma (*Opuntia* e *Nopalea*).



Na taxa de degradação dos carboidratos não fibrosos, os menores valores indicam que a sua energia foi disponibilizada de forma mais rápida. A taxa de degradação de carboidratos fibrosos representa a quantidade da fração fibrosa que está disponível para o micro-organismo e pelo tempo que essa fração demora para ser degradada. Um dos fatores

que pode ter contribuído para o aumento das taxas, foi uma maior quantidade de substratos de fácil acesso para os microrganismos ruminais.

O avanço da infestação reduziu a produção de gases na maioria dos genótipos (exceto IPA-100004) em virtude dos altos carboidratos fibrosos, observado pela elevação de FDN (Tabela 2.4) e redução dos não fibrosos (Tabela 2.5) nos genótipos IPA-100003, IPA-200016, IPA-200021 e IPA-200149 (Figura 3 e 4). Contudo, os aumentos dos CF pode estar relacionados tanto ao crescimento vegetativo como pelo estresse promovido pela infestação. Sabe-se que cinzas e fibras podem se correlacionar negativamente com a infestação (Khan et al., 2015). Shah et al. (2016) observaram que a FB (fibra bruta) correlacionou-se negativamente com as densidades de insetos, os carboidratos positivamente e a gordura correlacionou-se negativamente com o besouro saltador (*Alticini* sp.) e a lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) e positivamente com os demais insetos.

Na produção de gases, o aumento da infestação pode ter contribuído para a redução nos genótipos IPA-100003, IPA-200008 e IPA-200021. Já nos demais a redução da produção de gases observada deve se relacionar ao crescimento vegetativo e a maior deposição de compostos indigestíveis na parede celular, uma vez que a infestação não foi significativa nos genótipos IPA-200205, IPA-200016 e IPA-100004 (Tabela 2.2). Quanto ao IPA-200149, embora tenha ocorrido aumento crescente de colônias (Tabela 2.4), estas eram pouco desenvolvidas, com a não ocorrência de insetos adultos (Observações pessoais). As menores produções de gases no IPA-200021 e as maiores no IPA-200205 estão relacionadas às características genéticas (Tabela 2.7).

## 2.5 – CONCLUSÕES

A produção total de gases em genótipos de palma forrageira do gênero *Opuntia* reduz concomitante com a intensidade da infestação por *Dactylopius opuntiae*, com evidência nos genótipos IPA-100003 e IPA-200008 que apresentam maiores decréscimos de produção de CNF.

Na palma forrageira do gênero *Nopalea* a produção total de gases não está associada à infestação de *Dactylopius opuntiae*, a excessão do genótipo IPA-200021.

A intensidade de infestação da palma forrageira por *Dactylopius opuntiae* altera algumas frações do valor nutricional. Contudo, este estudo é pioneiro, sendo necessários mais estudos dessa natureza para verificar o comportamento das frações de MM, CNF e A+B1, PB, FDN, C dos carboidratos e a DEG MS durante a interação palma forrageira-cochonilha do carmim.

## 2.6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmedani, M. S., Haque, M. I., Afzal, S. N., Aslam, M., Naz, S. 2009. Varietal changes in nutritional composition of wheat kernel (*Triticum aestivum* L.) caused by *Khapra* beetle infestation. Pak. J. Bo. 41(3):1511-1519.
- Andrade, A.P., Souza, E.S., Silva, D.S., Silva, I.F., Lima, J.R. S. 2006. Produção animal no bioma caatinga: Paradigmas dos “pulsos-reservas”. Revista Brasileira de Zootecnia 35:138-155.
- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, USA, pp. 684.
- Boiça Júnior, A. L., Souza, B. H. S., Lopes, G. S., Costa, E. N., Moraes, R. F. O., Eduardo, W. I. 2015. A defesa das plantas ao ataque dos insetos. In: BUSOLI, A. C. et al. (Eds.). Tópicos em entomologia agrícola – VIII. Jaboticabal: Maria de Lourdes Brandel-ME. 2015. p. 161-179.
- Bruce, T.J.A. 2015. Interplay between insects and plants—dynamic and complex interactions that have coevolved over millions of years but act in milliseconds. J Exp Bot 66:455–465.
- Detmann, E., Souza, M. D., Valadares Filho, S. D. C., Queiroz, A. D., Berchielli, T. T., Saliba, E. O. S., Azevedo, J. A. G. 2012. Métodos para análise de alimentos. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 214.
- Dubeux Júnior, J.C.B., Santos, M.V.F., Cavalcante, M., Santos, D.C. 2013. Potencial da palma forrageira na América do Sul. Cactusnet Newsletter 13:29-40.

- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2011. Semiárido. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/sistema/semi%C3%A1rido/importancia.html>>. Acesso em: 10 dez. 2015.
- Falcão, H.M.; Oliveira, M.T.; Mergulhão, A.C.; Silva, M.V.; Santos, M.G. 2013 Ecophysiological performance of three *Opuntia ficus-indica* cultivars exposed to carmine cochineal under field conditions. *Sci Hortic* 150:419–424.
- Farias, I., Santos, D.C., Dubeux-Júnior, J.C.B. 2005. Estabelecimento e manejo da palma forrageira. p.105-128. In: MENEZES, R.S.C., SIMÕES, D.A., SAMPAIO, E.V.S.B. A palma no nordeste do Brasil: conhecimento atual e novas perspectivas de uso. Recife: ed. Universitária da UFRPE.
- Ferreira, M. A.; Pessoa, R. A. S.; Bispo, S. V. 2007. Otimização de dietas a base de palma forrageira e outras alternativas de suplementação para regiões semi-áridas. *Simpósio De Produção de Gado de Corte*, 6, 241-266.
- Gullan, P. J., Cranston, P. S. 2007. Os insetos: um resumo de entomologia. 3 ed. São Paulo, Rocca, 440p.
- Hao, P., Liu, C., Wang, Y., Chen, R., Tang, M., Du, B. e He, G. 2008. Herbivore-induced callose deposition on the sieve plates of rice: an important mechanism for host resistance. *Plant Physiology* 146(4):1810-1820.
- Holden, L.A., 1999. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. *Journal of Dairy Science* 82(8): 791-1794.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística «Estimativas da População Residente nos Municípios Brasileiros» 2015. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 1 de Julho de 2015. Consultado em 24 de setembro de 2015.
- Kant, M.R., Jonckheere, W., Knecht, B. et al. 2015. Mechanisms and ecological consequences of plant defence induction and suppression in herbivore communities. *Ann. Bot.* 115:1015–1051.
- Keskin, S.; Ozkaya, H. 2013. Effect of storage and insect infestation on the mineral and vitamin contents of wheat grain and flour. *Journal of economic entomology* 106(2):1058-1063.

- Keskin, S.; Ozkaya, H. 2015. Effect of storage and insect infestation on the technological properties of wheat. *CyTA-Journal of Food* 13(1):134-139.
- Khan, I. A., Habib, K., Akbar, R., Khan, A., Saeed, M., Farid, A., Alam, M. 2015. Proximate chemical composition of brinjal, *Solanum melongena* L. (Solanales: Solanaceae), genotypes and its correlation with the natural enemies in Peshawar. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 3(5): 07-11.
- Lopes, E.B., Albuquerque, I.C., Brito, C.H., Batista, J. D. L. 2009. Velocidade de infestação de *Dactylopius opuntia* Cockerell, 1896 em palma gigante na Paraíba. *Engenharia Ambiental* 6:196-205.
- Marin, R. 1987. Técnicas de colonización y dispersión de la ‘cochinilla del carmín’. *Revista Peruana de Entomología*, 30:118-120.
- Moura, J. G. 2012. Valor nutritivo e características anatômicas de variedades de palma forrageira (*Nopalea* sp. e *Opuntia* sp.) com diferentes níveis de resistência à cochonilha do carmim (*Dactylopius opuntiae* Cockerell). Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 97f.
- Msaddak, L.; Abdelhedi, O.; Kridene, A.; Rateb, M.; Belbahri, L.; Ammar, E.; Nasri, M.; Zouari, N. 2017. *Opuntia ficus-indica* cladodes as a functional ingredient: bioactive compounds profile and their effect on antioxidant quality of bread. *Lipids in Health and Disease*, 16:32.
- Rodrigo, E., Catalá-Oltra, M. Y., Granero, M. 2010. Estudio comparativo de la morfología y biología de *Dactylopius coccus* Costa y *D. opuntiae* (Cockerell) (Hemiptera: *Dactylopiidae*), dos especies presentes en la Comunidad Valenciana. *Boletín de Sanidad Vegetal* 36:23-35.
- Santos, D.C., Farias, I., Lira, M.A., Santos, M.V.F., Arruda, G.P., Coelho, R.S.B., Dias, F.M., Melo, J.N. 2006. Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) em Pernambuco. Recife: IPA, 48p. (IPA. Documento, 30).
- Santos, D. C.; Silva, M. C.; Bubeux Júnior, J. C. B.; Lira, M. A.; Silva, R. M. 2013. Estratégias para uso de cactáceas em zonas semiáridas: novas cultivares e uso sustentável das espécies nativas. *Revista Científica de Produção Animal*, 15(2):111-121.



- SAS, 2002. SAS® User's Guide: Statistics, Version 9.1 Edition. SAS Inc., Cary, NC, USA.
- Silva, A. A. G., de Oliveira, F. T., Souto, J. 2015. Zoneamento agrícola de risco climático da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill) para o estado de Sergipe. Embrapa Tabuleiros Costeiros-Comunicado Técnico (INFOTECA-E).
- Schofield, P.; Pitt, R. E.; Pell, A. N. 1994. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. Journal of Animal Science, 72(11): 2980-2991.
- Senger, C. C., Kozloski, G. V., Sanchez, L. M. B., Mesquita, F. R., Alves, T. P., & Castagnino, D. S. 2008. Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. Animal Feed Science and Technology, 146(1), 169-174.
- Shah, B.; Khan, I. A.; Khan, A.; Din, M. M. U. 2016. Correlation between proximate chemical composition and insect pests of maize cultivars in Peshawar. Journal of Entomology and Zoology Studies 4(1):312-316.
- Sniffen, C.J., O'Connor, J.D., Van Soest, P.J., Fox, D.G., Russell, J.B., 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. J. Anim. Sci. 70, 3562–3577.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., & France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Animal feed science and technology, 48(3-4), 185-197.
- Tilley, J.M.A., Terry, R.A., 1963. A two-state technique for in vitro digestion of forage crops. The Journal of the British Grassland Society, 18:104–111.
- Valente, T. N. P., Detmann, E., Queiroz, A. C. D., Valadares Filho, S. D. C., Gomes, D. I., & Figueiras, J. F. 2011. Evaluation of ruminal degradation profiles of forages using bags made from different textiles. Revista Brasileira de Zootecnia, 40(11), 2565-2573.
- Van Dam, A. R., May, B. 2012. A new species of *Dactylopius Costa* (*Dactylopius gracilipilus* sp. nov.) (Hemiptera: Coccoidea: Dactylopiidae) from the Chihuahuan Desert, Texas, U.S.A. Zootaxa 3573:33–39.

- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and no starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74:3583–3597.
- Vasconcelos, A. G. V., Lira, M. A., Cavalcanti, V. L. B., Santos, M. V. F., Willadino, L. 2009. Seleção de clones de palma forrageira resistentes à cochonilha-do-carmim (*Dactylopius* sp.). *Revista Brasileira de Zootecnia* 38:827-831.
- Weiss, W. P. 1993. Predicting Energy Values of Feeds. *Journal of Dairy Science*, 76(6): 1802-1811.
- Wetzel, W.C., Kharouba, H.M., Robinson, M., Holyoak, M., Karban, R. 2016. Variability in plant nutrients reduces insect herbivore performance. *Nature*, 539:425–427.

### CAPÍTULO III

---

**Metabólitos secundários de genótipos de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) infestados com *Dactylopius opuntiae***

## Metabólitos secundários de genótipos de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) infestados com *Dactylopius opuntiae*

### RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar a influência da interação inseto-planta no perfil metabólico de palmas forrageiras com resistências contrastantes ao *Dactylopius opuntiae*. Foram avaliados quatro genótipos de palma forrageira do gênero *Opuntia* (IPA-100003, IPA-200008, IPA-200016 e IPA-200149) e três do gênero *Nopalea* (IPA-100004, IPA-200021 e IPA-200205), com delineamento experimental inteiramente casualizado e esquema fatorial 7 x 3, que correspondem a 7 genótipos e 3 períodos de coleta (0, 60 e 90 dias de infestação com o *Dactylopius opuntiae*), com 3 repetições. Para as análises do perfil fotoquímico foram realizados testes para a identificação das principais classes (alcaloides, esteroides, taninos, flavonoides, e saponinas) presentes nos cladódios da palma. Para a similaridade da prospecção química os dados foram agrupados e representados graficamente em um dendrograma, agrupando-os a partir do coeficiente de correlação de Pearson usando como ferramenta computacional o DendroUPGMA. Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  foram processados no programa MestReNova e os deslocamentos químicos obtidos foram realizado análises multivariadas, utilizando o programa The Unscrambler. Observou-se a formação de cinco grupos. O gênero *Nopalea* ficou em dois grupos, apenas o IPA-100004 aos 60 dias e o IPA-200021 aos 90 ficaram em grupo diferente dos demais. Já o gênero *Opuntia* esteve presente em todos os grupos. O perfil fitoquímico dos genótipos do gênero *Nopalea* não foi alterado pela pressão de infestação. Já no gênero *Opuntia* foi evidente a mudança do perfil fitoquímico na interação inseto-planta, sobretudo nos genótipos IPA-200008 e IPA-100003. Os dois primeiros componentes principais explicaram 81% das variações das medidas originais. Observou-se que os deslocamentos químicos que mais influenciaram na resposta química da planta durante o ataque foram  $\delta\text{H}$  0,84, 0,88, 1,20, 1,24, 1,28, 3,84, 3,88, 4,04, 4,08, os quais influenciaram, principalmente, os genótipos aos 60 dias após a infestação. Logo, deve-se identificar os possíveis

compostos nesses deslocamentos e quais poderiam estar relacionados com as respostas da interação inseto-planta.

**Palavras-chaves:** interação, inseto-praga, multivariada, quimiometria

**Secondary metabolites of cactus pear genotypes (*Opuntia* and *Nopalea*) infested with *Dactylopius opuntiae***

**ABSTRACT**

The objective of this work was to evaluate the influence of insect-plant interaction on the metabolic profile of forage palms with contrasting resistance to *Dactylopius opuntiae*. Four genotypes of forage palm of the genus *Opuntia* (IPA-100003, IPA-200008, IPA-200016 and IPA-200149) and three genotypes of the genus *Nopalea* (IPA-100004, IPA-200021 and IPA-200205) were evaluated. and factorial scheme 7 x 3, corresponding to 7 genotypes and 3 collection periods (0, 60 and 90 days of infestation with *Dactylopius opuntiae*), with 3 replicates. For the analyzes of the photochemical profile, tests were performed to identify the main classes (alkaloids, steroids, tannins, flavonoids, and saponins) present in cladodes of the cactus pear. For the similarity of the chemical prospection the data were grouped and represented graphically in a dendrogram, grouping them from the Pearson correlation coefficient using DendroUPGMA as computational tool. The  $H^1$  NMR spectra were processed in the MestReNova program and the chemical shifts obtained were performed multivariate analyzes using the program The Unscrambler. The formation of five groups was observed. The genus *Nopalea* was in two groups, only the IPA-100004 at 60 days and the IPA-200021 at 90 years presented a different group from the others. The genus *Opuntia* was present in all groups. The phytochemical profile of genotypes of the genus *Nopalea* was not altered by infestation pressure. In the *Opuntia* genus, it was evident the phytochemical profile change in the insect-plant interaction, mainly in the genotypes IPA-200008 and IPA-100003. The first two major components accounted for 81% of the variations of the original measurements. It was observed that the chemical peaks that most

influenced the chemical response of the plant during the attack were  $\delta H$  0.84, 0.88, 1.20, 1.24, 1.28, 3.84, 3.88, 4.04, 4.08, which mainly influenced the genotypes at 60 days after infestation. Therefore, it is necessary to identify the possible compounds in these displacements and which could be related to the responses of the insect-plant interaction.

**Keywords:** interaction, insect-plague, multivariate, chemometrics

### 3.1 - INTRODUÇÃO

A palma (*Opuntia* e *Nopalea*) é uma forrageira importante para os pecuaristas de regiões áridas e semiáridas por ser adaptada a tais climas. Dentre os mecanismos adaptativos, tem-se a sua eficiência no uso da água (eficiência na absorção, aproveitamento e perda, quando comparada a plantas de metabolismo  $C_3$  e  $C_4$ ), devido ao seu mecanismo fotossintético MAC (metabolismo ácido das crassuláceas). Portanto, a palma representa uma importante reserva forrageira, rica em água e energia, características significativas para a sustentabilidade da pecuária nordestina, utilizada como base alimentar para o gado leiteiro na época seca, principalmente nos estados de Pernambuco, Alagoas, Paraíba e Sergipe (Lima et al., 2009).

Nutricionalmente, as principais características desta forrageira são: alto conteúdo de água, minerais, carboidratos solúveis, vitaminas e elevada digestibilidade, com variações em sua composição química em função da espécie, cultivar, ordem do cladódio, estágio fenológico e fisiológico, condições edafoclimáticas, dentre outros (Gomes, 2011). Desta forma, é inegável o seu potencial para contribuir no desenvolvimento pecuário das zonas áridas e semiáridas. Todavia, a palma, assim como as demais plantas, são submetidas em seus ecossistemas a diversos fatores estressantes, tanto os bióticos como os abióticos.

Na palma forrageira, o inseto cochonilha-do-carmim (*Dactylopius opuntiae*) passou a destruir os palmais no Brasil a partir de 2001, sobretudo no Nordeste, dizimando-os rapidamente em virtude de sua alta proliferação e disseminação, comprometendo as cadeias produtivas como a bovinocultura leiteira com perdas estimadas em mais de 100 mil hectares de palma (Lopes et al., 2009).

Evolutivamente, mecanismos de defesa vegetal foram desenvolvidos, quer mudando a composição e as propriedades da parede celular ou mudando seu metabolismo, o que proporcionou o surgimento de compostos tóxicos e retardantes, que foram transferidos para os seus descendentes. Em contrapartida, os insetos passaram a desenvolver diversos mecanismos fisiológicos e comportamentais para se adaptar às defesas das plantas, transferindo-os geneticamente para seus descendentes (Bruce et al., 2015).

Sabe-se que as defesas das plantas ocorrem tanto no tempo quanto no espaço por redes reguladoras altamente complexas que são moduladas por interações com outras vias de sinalização, nas quais as defesas podem ser constitutivas ou induzidas, respondendo rapidamente quando são atacadas novamente (Bruce et al., 2015). No caso dos insetos sugadores, por exemplo, a composição da seiva do floema não só influencia na decisão do inseto de aceitar ou rejeitar um hospedeiro, como também determinará o seu crescimento e reprodução (Pritchard et al., 2007).

Segundo Panis et al. (2016), as plantas são capazes de sintetizar uma gama de metabólitos secundários que servem como defesa ao ataque de insetos fitófagos. Por outro lado, os insetos podem responder com contra-adaptações para contornar as defesas químicas das plantas, conduzindo a mudanças fenotípicas e genéticas. Os insetos, por exemplo, são capazes de desintoxicar ou até mesmo sequestrar toxinas produzidas pelas plantas e utilizá-las para se proteger dos inimigos naturais (Opitiz e Muller, 2009). O inseto *Dactylopius opuntiae*, por exemplo, produz o ácido cármico como mecanismo antimicrobiano e antipredatório (Campana et al., 2015).

Uma planta resistente é aquela que é menos danificada que uma outra, em condições edafoclimáticas similares (Boiça Júnior et al., 2013). Todavia, não existe uma escala absoluta para medir a resistência, sendo usualmente realizadas comparações entre plantas para que, em seguida, sejam classificadas em diferentes graus de resistência (imunidade, alta resistência, resistência moderada, suscetibilidade e alta suscetibilidade) (Lara, 1991). Quanto ao tipo de resistência ou categorias funcionais essas podem ser antixenose ou não preferência, antibiose e tolerância, as quais não ocorrem de forma isolada, sendo comum a combinação dessas características (Lara, 1991; Gullan e Cranston, 2007).

Frente a este desafio, a melhor alternativa para se conviver com a cochonilha-do-carmim é por meio da seleção de genótipos de palma forrageira resistentes. Sendo assim, tornam-se necessários o aprofundamento nos estudos de interação inseto-planta que contribuam para o melhoramento genético e as avaliações do perfil metabólico da palma durante a infestação, contribuindo para a seleção dos genótipos mais adaptados e com boa qualidade nutricional. Portanto, objetivou-se com este trabalho avaliar a influência da interação inseto-planta no perfil metabólico de palmas forrageiras com diferentes graus de resistência ao *Dactylopius opuntiae*.

## 3.2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 - Local do experimento e material genético

O experimento foi desenvolvido em estufa de vegetação da Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG/UFRPE), localizada no município de Garanhuns-PE, na mesorregião Agreste e na Microrregião Garanhuns, a uma altitude aproximada de 842 metros e coordenadas geográficas de 08°53'25" S e 36°29'34" W, onde o clima é do tipo tropical chuvoso com verão seco.

Foram avaliados sete genótipos de palma forrageira do gênero *Opuntia* (IPA-100003 - *Opuntia ficus-indica* Mill, IPA-200008 - *Opuntia atropes* Rose, IPA-200149 - *Opuntia larreri* F.A.C. Weber, e IPA-200016 - *Opuntia stricta* Haw) e *Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck (IPA-100004, IPA-200021 e IPA-200205). O IPA-100003 é considerado susceptível, os IPA-200008 e IPA-200021 são considerados de resistência intermediária e os demais resistentes aos *Dactylopius Opuntiae*. (Tabela 3.1) (Vasconcelos et al., 2009; Santos et al., 2013).

Os cladódios para a implantação do estudo foram provenientes do banco de germoplasma do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), localizado no município de Arcoverde-PE. Após a coleta, esses cladódios foram armazenados durante uma semana em lugar seco, arejado e ao abrigo do sol, para a cicatrização do corte. Antes do plantio, todos os cladódios foram higienizados com uma solução de hipoclorito a 2% e detergente neutro a 20%.



Tabela 3.1-Genótipos de palma forrageira avaliadas com diferentes graus de resistência ao inseto *Dactylopius opuntiae*

Espécies	Acesso	Nome popular	Grau de resistência
<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill	IPA-100003	IPA-20	Susceptível
<i>Opuntia atropes</i> Rose	IPA-200008	F-08	Intermediário
<i>Opuntia strica</i> Haw	IPA-200016	Orelha de Elefante Mexicana	Resistente
<i>Opuntia larreri</i>	IPA-200149	V-19	Resistente
<i>Nopalea cochenillifera</i> Salm-Dyck	IPA-100004	Miúda	Resistente
<i>Nopalea cochenillifera</i> Salm-Dyck	IPA-200021	F-21	Intermediário
<i>Nopalea cochenillifera</i> Salm-Dyck	IPA-200205	IPA-Sertânia	Resistente

### 3.2.2 – Tratamentos e implantação do estudo

Foram utilizados os sete genótipos de palma mencionados anteriormente, os quais foram infestados com exemplares *Dactylopius Opuntiae*, realizando-se sete colhetas a cada 15 dias (0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de infestação com o *Dactylopius Opuntiae* com cinco repetições), que ocorreu aos 78 dias após a implantação do experimento, quando cerca de 20% das unidades experimentais estavam infestadas (exceto do tratamento 0 dias).

Os exemplares (cladódio base) foram cultivados em vasos com capacidade de 12 L, sendo cultivados um cladódio de cada genótipo por vaso com cinco repetições, totalizando 245 unidades amostrais. Todos os vasos foram preenchidos com solo franco argilo-arenoso e esterco caprino na proporção 10:1 (v/v) (Tabela 3.2), regados a cada 15 dias com 19 mm de água. A temperatura e umidade dentro da estufa foram monitoradas diariamente durante todo o período experimental com auxílio de um termohigrógrafo. Durante a condução do estudo a umidade média foi de 62,52% e a temperatura de 25,66 °C (Figura 3.1).

Após 60 dias de estabelecimento dos cladódios nos vasos, foram realizados o desbaste para uniformização, deixando somente três cladódios primários em cada vaso. Após oito dias, cada vaso foi infestado com exemplares de *Dactylopius opuntiae*. A

metodologia utilizada para a colonização e dispersão do *D. opuntiae* foi a infestação através de pedaços de cladódios com cerca de 65 colônias (Marin, 1987).

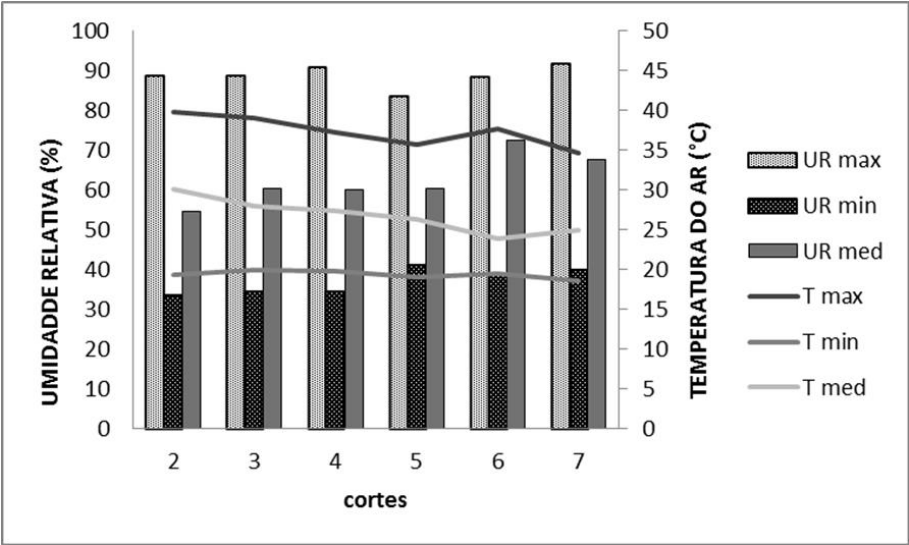
Quando aproximadamente 20% das unidades experimentais foram infestadas (exceto o tratamento 0 dias), fato que ocorreu aos 10 dias após a indução da infestação, o tratamento 0 dias foi avaliado e retirado para processamentos. Assim, iniciou-se o experimento propriamente dito até os 90 dias de infestação, com coletas a cada 15 dias.

Tabela 3.2- Características químicas e físicas do solo e do composto orgânico utilizados nos vasos

Fertilidade do solo										Física do solo					Composto orgânico				
pH	P	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	H <sup>+</sup> +Al <sup>+3</sup>	Al <sup>+3</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	SB	CTC	MO	Areia	Silte	Argila	Textura	MS	MO	N	P	K
-----mg dm <sup>-3</sup> ----			-----cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----					g kg <sup>-1</sup>		g kg <sup>-1</sup>		g kg <sup>-1</sup>				-----%-----	-----g kg <sup>-1</sup> -----		
5,5	11,94	181,45	0,07	4,70	0,10	0,29	0,43	1,25	5,95	23,98	677	70	253	Franco argilo arenosa	81,25	53,63	25,55	12,78	15,75

P, K, Na: Extrator Mehlich 1, H + Al: Extrator Acetato de Cálcio 0,5 M, pH 7,0, Al, Ca, Mg: Extrator KCl 1 M, SB: Soma de Bases Trocáveis, CTC: Capacidade de Troca Catiônica, M.O.: Matéria Orgânica da fertilidade – Walkley-Black, MO: Método da Mufla (composto), N, P, K Digestão com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Figura 3.1- Dados de temperatura e umidade durante a condução do estudo na estufa de vegetação



### 3.2.3 – Prospecção fitoquímica

Para a realização das análises laboratoriais foram coletados três cladódios primários junto com o cladódio basal rente ao solo. Após a coleta, o material foi limpo, cortado e seco em estufa de circulação forçada de ar a 45°C, em seguida, triturado em moinho tipo Willey®. A extração etanólica foi realizada com etanol 95%, durante oito dias, sob agitação diária, renovando-se o solvente extrator a cada dois dias. Após esse período, as soluções extrativas foram filtradas e concentradas por meio de evaporador rotativo sob destilação a vácuo a 40 °C, obtendo-se os extratos de etanol bruto, os quais foram mantidos em frascos de vidro hermeticamente fechados em temperatura ambiente (22 °C) até sua utilização.

Para a identificação das principais classes de compostos químicos, empregaram-se os protocolos descritos por Matos (2009) e Desoti et al. (2011). Os alcaloides foram detectados pelo método de precipitação, usando-se os reativos de *Bouchardat* (A), *Mayer* (B), *Dragendorf* (C) e *Bertrand* e o ácido sílico-túngstico (D). Os esteroides foram detectados pela reação de *Liebermann-Burchard*. Os taninos pelos métodos de precipitação com sais de ferro e gelatina. Os flavonoides detectados pelas reações de *Shinoda* e *Taubouk*. As saponinas pela agitação do extrato aquoso com formação de espuma persistente.

### 3.2.4 – Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H dos extratos etanólicos brutos foram obtidos em espectrômetro DRX 300 (Bruker), operando a 200 MHz. Para a análise do núcleo de <sup>1</sup>H, as amostras foram preparadas com os solventes CDCl<sub>3</sub> (clorofórmio deuterado) e DMSO, seguindo um mesmo padrão de concentração (1 mg mL<sup>-1</sup> para a fase apolar, 5 mg mL<sup>-1</sup> para a fase intermediária, 10 mg mL<sup>-1</sup> para o extrato bruto), o mesmo volume (700 µL) e o mesmo número de scans (32). As amostras foram colocadas em tubos de RMN de cinco mm de diâmetro e posteriormente na sonda de cinco mm. Os parâmetros de aquisição típicos incluíram frequência de observação de 200,0 MHz. A sequência de pulsos usada foi S2PUL, que consistiu no atraso de relaxamento de 10 s, pulso de 90° e tempo de aquisição de 2 s (Costa, 2012). Os espectros gerados foram

processados pelo programa MestReNova®, versão 6.1.0 (Cobas et al., 2010) e os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm).

### **3.2.5 – Análise estatística**

Para a similaridade da prospecção química, os dados foram agrupados e representados, graficamente, em um dendrograma, no qual o eixo das abscissas representou os níveis em que os indivíduos foram agrupados e o eixo das ordenadas corresponde aos indivíduos. O corte do dendrograma foi feito ao nível de 50% de aglomeração gerando um número específico de subgrupos. Os resultados foram agrupados pelo coeficiente de Pearson, usando o UPGMA (método de grupo de pares não ponderado com aritmética), com a ferramenta computacional DendroUPGMA (Garcia-Vallvé, 2006).

As análises de componentes principais dos espectros foram realizadas a partir dos deslocamentos químicos obtidos pelos espectros, em faixa que varia de 0,1 a 12 ppm, descontando-se a faixa entre 3,2-3,4 ppm, na qual havia a maior concentração de água, o resíduo de DMSO considerando os intervalos entre 2,48-2,52 ppm e o DMSO (2,50 ppm). O software utilizado foi o The Unscrambler® versão 9.8 (CAMO ASA, Oslo, Noruega).

## **3.3 – RESULTADO**

### **3.3.1 – Prospecção fitoquímica**

O genótipo IPA-100003 não resistiu ao alto índice de dispersão e infestação ao *D. opuntiae*, permanecendo no experimento até 60 DAI (Tabela 3.3). Alguns exemplares desse genótipo estavam em estágio avançado de infestação, desprendendo-se da base dias antes de completar 60 dias e apresentaram doenças secundárias e putrefação (IPA-100003\*).

Tabela 3.3-Perfil fitoquímico de genótipos de palma forrageira, dos gêneros *Opuntia* e *Nopalea*, aos 0, 60 e 90 dias de infestação com o *D. opuntiae*.

Genótipos	Alcaloides				Esteroides (Liebermann- Burchard)	Taninos		Flavonoides		Saponinas
	A	B	C	D		Gelatina 0,5%	FeCl <sub>3</sub> 2%	Fita-magnésio (Shinoda)	Fluorescência (Taubouk)	Espuma
0 dia de infestação										
IPA-100003	-	-	-	-	+	-	+	+++	+++	++
IPA-200016	-	-	-	-	++	-	+	++	+++	++
IPA-200008	-	-	-	-	++	+	+	++	+++	++
IPA-100004	-	-	-	-	++	-	+	++	+++	+
IPA-200021	-	-	-	-	+	-	+	++	+++	+
IPA-200205	-	-	-	-	++	-	+	+++	+++	+
IPA-200149	-	-	-	-	+	-	-	+++	+++	-
60 dias de infestação										
IPA-100003	-	-	-	-	+	+	+++	+++	++	-
IPA-100003*	-	-	-	-	++	-	+	-	+	-
IPA-200016	-	-	-	-	++	-	-	-	++	+
IPA-200008	-	-	-	-	+++	-	-	++	++	+++
IPA-100004	-	-	-	-	++	-	-	++	+++	-
IPA-200021	-	-	-	-	++	+	+	+	++	++
IPA-200205	-	-	-	-	+	+	+	-	++	+
IPA-200149	-	-	-	-	+++	-	-	+	+++	-
90 dias de infestação										
IPA-200016	-	-	-	-	-	+	+	+++	+++	-
IPA-200008	-	-	-	-	+	-	+	+	++	-
IPA-100004	-	-	-	-	+	-	+	++	+++	-
IPA-200021	-	-	-	-	+++	-	-	-	++	-
IPA-200205	-	-	-	-	++	-	+	-	++	++
IPA-200149	-	-	-	-	+	-	+	-	+++	++

Legenda: (A) *Bouchardat*, (B) *Maye*, (C) *Dragendorf*, (D) *Bertrand* ou ácido sílico-túngstico;  
“+++” (intensidade alta), “++” (intensidade média), “+” (intensidade baixa), “-” (reação negativa)

Em todas as amostras, os alcaloides não foram detectados. Os esteroides foram detectados no IPA-100003 aos 0 dias em baixo teor, aumentando aos 60 dias para teor médio apenas nos exemplares que apresentaram doenças secundárias. No IPA-200008, o teor foi médio (++), aumentando aos 60 (+++) e reduzindo (+) aos 90. No IPA-200016 o teor inicial foi médio (++) e aos 90 dias reduziu-se (+). O teor foi médio (++) para o genótipo IPA-100004 até os 60 dias, quando houve redução aos 90 dias (+). No IPA-200021 observou-se um aumento gradativo até os 90 dias e no IPA-200205 a intensidade foi mediana aos 0 dias, reduzindo aos 60 e tornando-se novamente mediana aos 90 dias.

Os taninos foram constatados no gênero *Opuntia*, aos 60 dias no IPA-100003 (teor elevado) e ausentes no IPA-200008 e com baixos teores no IPA-200016. No gênero *Nopalea* os taninos foram baixos, sendo ausentes apenas no IPA-100004 aos 60 dias e no IPA-200021 aos 90 dias.

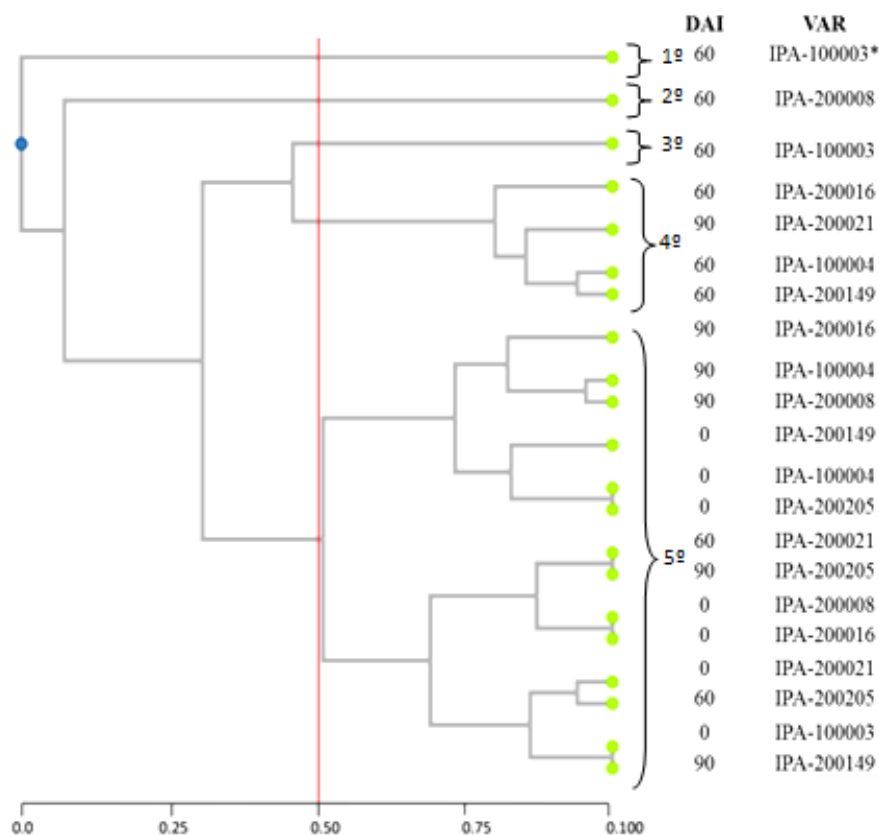
O conteúdo de flavonoides foi elevado em todos os genótipos do gênero *Opuntia* a zero dia, tornando-se medianos aos 60 DAI, sendo que no genótipo que apresentou doenças secundárias foram baixos os teores de flavonoides. Os flavonoides no gênero *Nopalea* foram de altas intensidades a zero dia e o IPA-100004 permaneceu com o mesmo teor durante todo o estudo e nos demais houve redução para média intensidade a partir dos 60 dias.

Inicialmente, todos os genótipos do gênero *Opuntia* possuem média concentração de saponinas, aos 60 dias apenas no IPA-200008 (+++) e no IPA-200016 (+) houve alteração e aos 90 não foram detectados. Em todos os genótipos do gênero *Nopalea* há uma pequena intensidade de saponinas que se tornou ausente para o IPA-100004 a partir de 60 DAI; no IPA-200021 houve aumento aos 60 dias e aos 90 foi inexistente e no IPA-200205 houve um aumento aos 90 dias.

Com a análise de agrupamento, ocorreu a formação de cinco subgrupos, com nível de 50% de similaridade (Figura 3.2), onde estão inseridos: subgrupo 1 (IPA-100003 aos 60 dias e em estado de putrefação); subgrupo 2 (IPA-200008 aos 60 dias); subgrupo 3 (IPA-100003 aos 60 dias sem estado de putrefação); subgrupo 4 (IPA-100004, IPA-200016 e IPA-200149 aos 60 dias e IPA-200021 aos 90 dias); subgrupo 5 (todas os genótipos aos zero e 90 dias, exceto o IPA-200021, incluindo também o IPA-200021 e IPA-200205 aos

60 dias). O gênero *Nopalea* ficou em dois grupos, apenas o IPA-100004 aos 60 dias e o IPA-200021 aos 90 estavam em outro grupo diferente dos demais. Já os do gênero *Opuntia* estiveram presentes em todos os grupos.

Figura 3.2-Dendrograma dimensional representando a similaridade entre o perfil fitoquímico de palma forrageira infestada com *D. opuntiae*. \* = IPA-100003 aos 60 dias em estado necrótico; DAI= Dias após infestação; VAR=Genótipos



Os sinais de  $^1\text{H}$  localizados entre 0,8 a 3,0 ppm são referentes aos lipídeos, esteroides, mono e diterpenos, os sinais entre 3,2 a 5,0 ppm podem ser encontrados heteroátomos das substâncias glicosiladas e C-H de CSP<sup>2</sup>, os sinais entre 5,0 e 5,8 aos  $^1\text{H}$  dos açúcares redutores e a faixa entre 6,0 e 8,0 ppm aos  $^1\text{H}$  ligados ao anel aromático (compostos fenólicos) (Ribeiro e Souza, 2007; Iulianelli e Tavares, 2011).



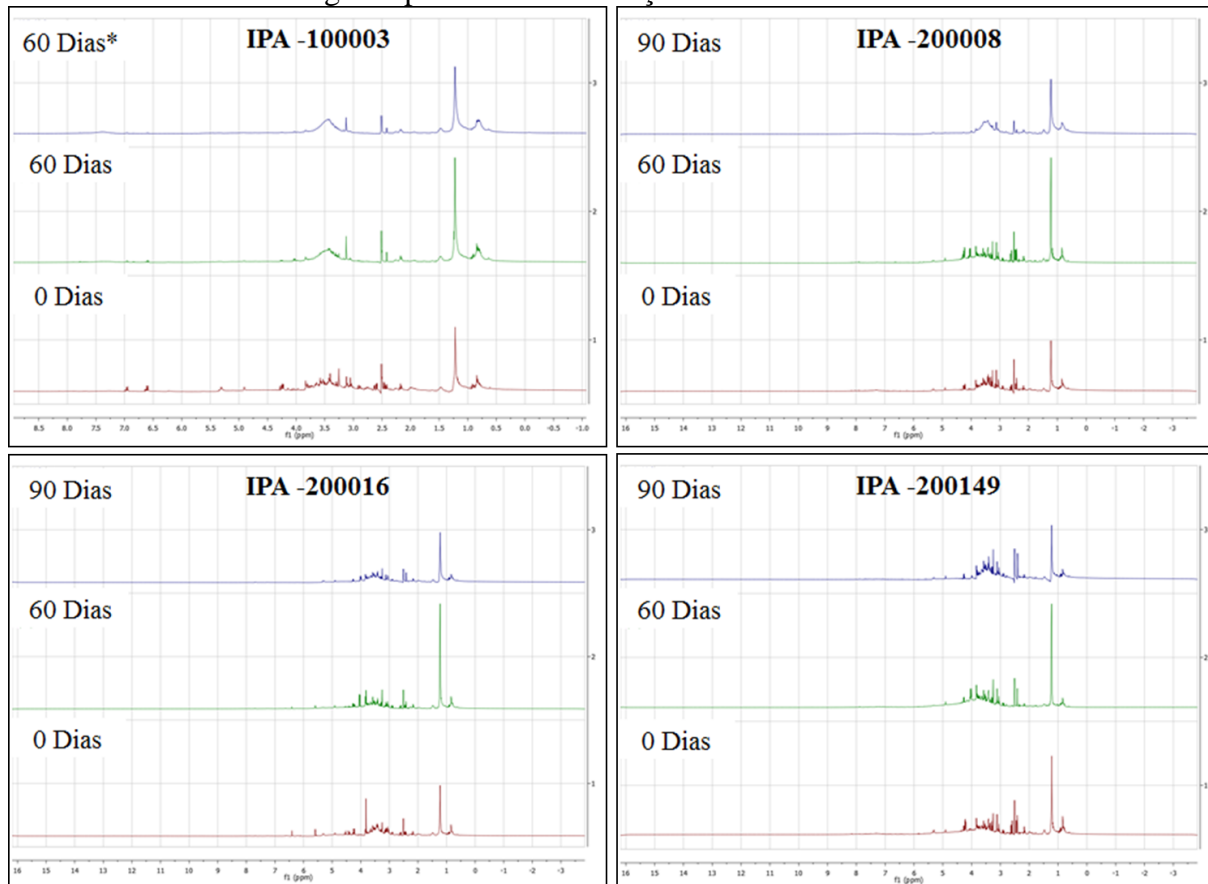
### 3.3.2– Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de $^1\text{H}$

Observou-se (Figura 3.3) que o perfil dos espectros dos genótipos de palma forrageira do gênero *Opuntia* sinalizou para divergência de substâncias entre os grupos de compostos químicos. Verificou-se que a zero dia o genótipo IPA-100003 apresentou sinais na região de aromáticos com predominância de derivados fenólico (6,6-7,0 ppm). Além disso, há intensidade significativa de sinais de unidades osídicas (3,0-4,9 ppm) e sinais correspondentes a faixa entre 1,2 e 5,30 ppm. Com 60 dias de infestação há sinais fenólicos entre 7,6-7,9 ppm, os quais são mais intensos que aos 0 dias. Houve diminuição dos sinais 6,6-7,0 ppm, das unidades osídicas e dos ácidos graxos insaturados e presença de ácido ou álcool de cadeia linear. No estado avançado de putrefação (IPA-100003 aos 60 dias\*), houve manutenção do padrão fenólico, porém em menor intensidade quando comparado com os exemplares não infestados do mesmo genótipo e diminuição significativa de ácidos graxos insaturados.

No genótipo IPA-200008, houve a presença de compostos fenólicos, unidades osídicas e ácidos graxos insaturados a 0 dia e 60 dias. Já aos 90 dias, houve diminuição de compostos fenólicos e de unidades osídicas e aumento de álcoois ou ácidos lineares de cadeia longa. No genótipo IPA-200016 observou-se a presença de sinais na região de aromáticos, destacando o sinal 6,40 ppm, que diferiu completamente do IPA-100003. O padrão de aromáticos foi reduzido aos 60 dias e aos 90 dias as unidades osídicas mantiveram o mesmo perfil, com aumento de álcoois ou ácidos lineares saturados.

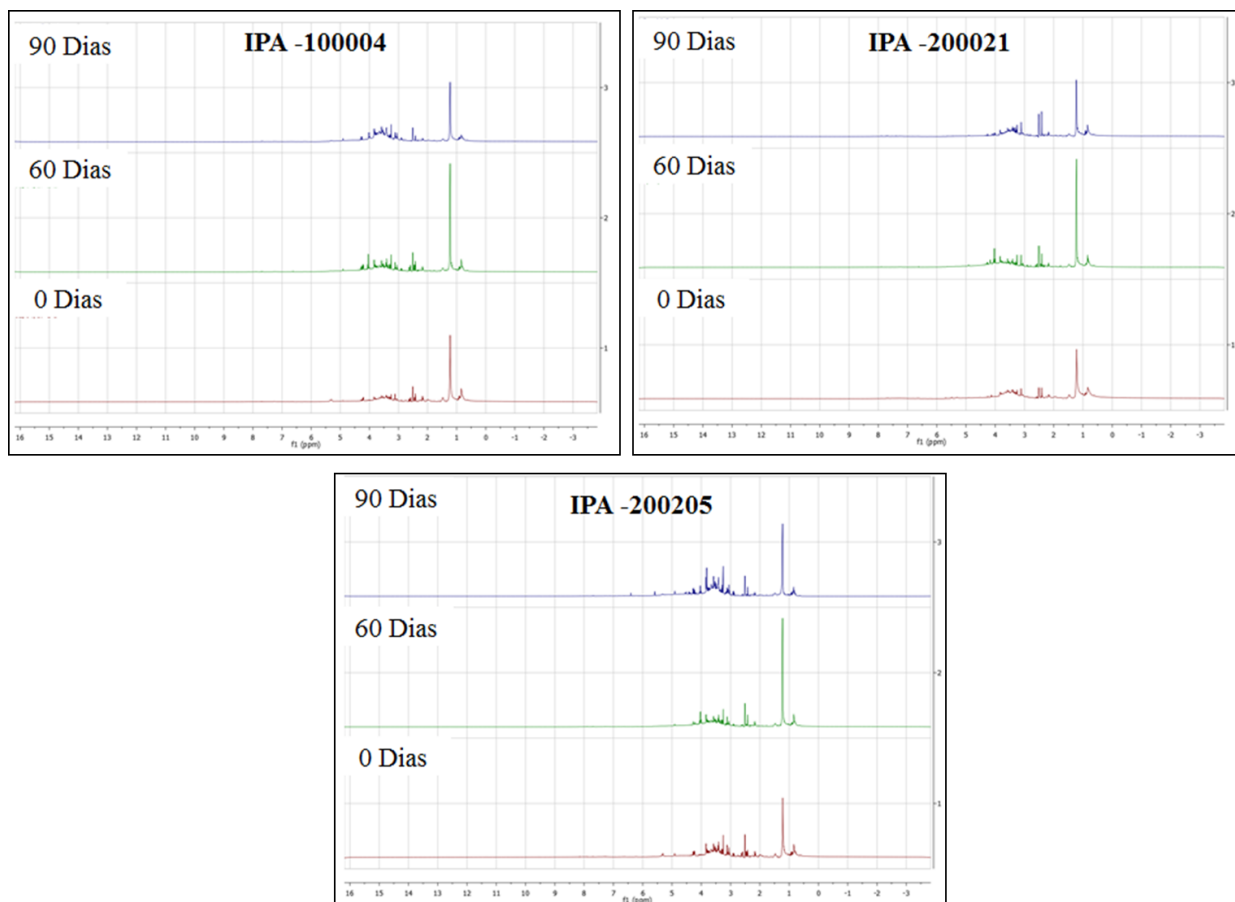
No genótipo IPA-200149, os sinais de alifáticos acíclicos entre 0,82 a 0,85 ppm diminuíram de intensidade a partir dos 60 dias. Pequeno sinal foi visualizado entre 1,15 a 1,25 ppm aos 0 dias e que desapareceu nos demais dias. Houve a formação de um sinal aos 0 dias entre 1,20 a 1,25 ppm e dois nos demais dias. Entre 2,40 a 2,65 ppm foram observados três dupletos, um triplete e um quinteto aos 0 dias e nos demais dias apenas um quinteto e um singlete. As unidades osídicas no intervalo de 4 a 4,05 ppm foram constituídas de dois dupletos aos 60 dias e de dois dupletos nos intervalos 4,20 a 4,25 ppm aos 0 dias.

Figura 3.3-Espectro de Ressonância nuclear magnética de  $^1\text{H}$  de genótipos de palma forrageira do gênero *Opuntia* infestadas com *Dactylopius opuntiae* aos 0, 60 e 90 dias. \* = genótipo em estado avançado de necrose



Observou-se o perfil dos espectros dos genótipos de palma forrageira do gênero *Nopalea* (Figura 3.4). O genótipo IPA-100004 resultou em pouca alteração durante os dias de infestação, com presença de sinais de baixa intensidade entre 0,80 a 0,85 ppm a zero e 60 dias, os quais desapareceram aos 90 DAI. Um singlete alifático foi visualizado aos 0 dias entre 1,20 a 1,25 ppm e nos demais dias um duplete, que apresentou maior intensidade aos 60 dias. Foram observados a zero e 60 dias, no intervalo 2,40 a 2,65 ppm, 12 sinais e aos 90 dias observou-se apenas sete. A zero dia verificou-se a baixa intensidade de unidades osídicas no intervalo 2,80 a 4,10 ppm, os quais aumentaram aos 60 e 90 dias, sendo semelhantes entre si (exceto entre 4 a 4,10 ppm).

Figura 3.4-Espectro de Ressonância nuclear magnética de  $^1\text{H}$  de genótipos de palma forrageira do gênero *Nopalea* infestadas com *Dactylopius opuntiae* aos 0, 60 e 90 dias.



Foram observadas diferenças no perfil do deslocamento químico entre os dias de infestação no IPA-200021, com deslocamentos 2,6, 3 e 4 ppm. Nos intervalos de 1,15 a 1,25 ao 0 dias verificou-se um sinal que aumentou de intensidade aos 60 dias, formando um duplete e que, aos 90 dias voltou ao comportamento inicial. Entre 2,4 a 2,6 ppm, a intensidade e quantidade de sinais aumentaram com os dias de infestação e entre 4 a 4,05 foram observados dois dupletos no intervalo 4 a 4,05ppm.

No IPA-200205, no intervalo de 1,5 a 1,25 ppm, aos zero dia verificou-se a presença de um sinal e nos demais dias de dois, com maior intensidade aos 60 dias. A zero dia de infestação, nos intervalos entre 2,45 a 2,52 e 2,57 a 2,62 ppm, foram observados sinais que desapareceram nos demais dias. As unidades osídicas, dos intervalos 4 a 4,05

ppm surgiram aos 60 e 90 dias. Aos 90 dias de infestação, verificou-se aumento de intensidade dos sinais aos 3,25, 3,81 e 3,83 ppm.

### 3.4 – DISCUSSÃO

Os alcaloides não foram detectados em nenhum dos cladódios dos genótipos de palma durante a triagem fitoquímica, contudo pode ocorrer a não detecção de alcaloides em cactáceas neste tipo de análise. Desta forma, outras análises mais sensíveis como espectrometria de massa, cromatografia líquida, cromatografia gasosa e ressonância magnética nuclear podem ser utilizadas para a detecção do perfil de alcaloides presentes nos cladódios de palma forrageira.

A ocorrência dos esteróis verificados nesse estudo pode se dar devido à presença de  $\beta$ -sitosterol (87%) e campesterol (8,5%), os quais são abundantes em palma forrageira (Stintzing; Carle, 2005; Msaddak et al., 2017), podendo ter ação deterrente ao *D. opuntiae* e serem acionados como mecanismos de respostas induzidas. Embora os insetos necessitem da ingestão dos fitoesteróis para sintetizar o colesterol, muitos esteróis vegetais possuem atividades inseticidas, como demonstrado por Díaz et al. (2014), onde a atividade do  $\beta$ -sitosterol aumentou em comparação com a fração de onde foi isolada, revelando ser ativo contra *Myzus persicae* (pulgão) e *Epilachna paenulata* (besouro).

Aos 60 DAI, as palmas do gênero *Opuntia*, classificadas como de resistência intermediária (IPA-200008) e resistente (IPA-200016), aumentaram a intensidade de esteroides e aos 90 dias reduziram, pois já não havia mais a necessidade da produção desse composto, o que pode indicar que ele foi requerido para defesa, enquanto na susceptível (IPA-100003) não houve aumento de intensidade ou passou a aumentar tardiamente. No gênero *Nopalea*, o IPA-200021 (resistência intermediária) aumentou a intensidade de esteroides que pode ser início de um mecanismo de defesa. Em genótipos dessa natureza é provável que haja maior demanda de tempo para responder às investidas dos insetos, diferentemente de genótipos resistentes como o IPA-100004 e o IPA-200205, nos quais as produções medianas desse composto (++) foram suficientes para impedir a infestação.

As saponinas são tóxicas devido a sua complexação, interferindo na absorção no sistema digestório dos insetos, pois estas interagem com o colesterol e causam distúrbio da síntese de ecdisteróides, as consequências são anti-alimentação, perturbação da muda, regulação do crescimento e mortalidade (Chaieb, 2010). Geralmente, esses compostos tendem a se reduzir com a maturidade da planta, contudo, o aumento no genótipo IPA-200008 pode estar relacionado às suas propriedades defensivas. Já nos genótipos do gênero *Nopalea* não há uma clara influência da sua produção com a infestação, acreditando-se que estejam relacionadas com as características inerentes ao genótipo.

Os taninos são polímeros fenólicos com propriedades de defesa vegetal, que podem reduzir o crescimento e a sobrevivência de muitos insetos fitófagos, pois se ligam às proteínas e reduzem a eficiência de absorção de nutrientes, além de causarem lesões no intestino médio dos insetos (War et al., 2012). No presente estudo, verificou-se que no gênero *Opuntia* há produção de taninos com baixa intensidade e que no genótipo susceptível (IPA-100003) aumentou a produção de taninos (+++) após a infestação. Contudo, não houve êxito de recuperação, pois a alta infestação, que chegou a 3.936,44 colônias (Tabela 2.2-Capítulo II), consumiu as reservas energéticas, sobretudo as de amido, consequentemente, doenças secundárias passaram a se propagar, ocasionando a morte da maioria dos exemplares do genótipo IPA-100003 antes de 60 DAI. No gênero *Nopalea*, as variações dos teores de taninos estão mais relacionadas às características dos genótipos, com a predominância de pouca intensidade em todos os tratamentos no método de  $\text{FeCl}_3$  e praticamente ausente no método da gelatina.

Os flavonóides podem proteger a planta contra os danos causados pela luz ultravioleta, serem utilizados de maneira eficiente como inseticida (rotenonas) e limitarem a propagação de patógenos invasores (fitoalexinas) (Dewick, 2009). Na palma forrageira, são os metabólitos mais abundantes (Msaddak et al., 2017). Inicialmente todos os genótipos do gênero *Opuntia* apresentaram alta intensidade, porém a pressão da infestação causou redução desses compostos em todos os genótipos, principalmente no susceptível (IPA-100003). No de resistência intermediária, houve estabilização e no resistente aumentou aos 90 dias de infestação. No gênero *Nopalea*, inicialmente todos os genótipos possuíam alta intensidade. Porém, com a pressão da infestação, houve redução desses compostos nos

genótipos IPA-200021 e IPA-200205 (++) pelo teste de Taubouk e ausência aos 90 dias pelo teste de Shinoda.

Todos os genótipos ao zero e 90 dias (exceto IPA-200021) foram similares no perfil fitoquímico. Aos 60 dias, observou-se mudança no perfil o que contribuiu para a formação dos cinco subgrupos, com maior distanciamento dos genótipos IPA-200008 e IPA-100003 aos 60 dias, o que evidencia a resposta fitoquímica diante da pressão de infestação em genótipos de resistência intermediária e susceptível ao *D. opuntiae*, respectivamente. No genótipo IPA-100003, houve diferenciação entre os dias de infestação (formação de três grupos), observando-se um distanciamento entre os exemplares de palma não necrosados e os exemplares em que a pressão de infestação causou necrose.

Os resultados indicam que o perfil fitoquímico dos genótipos do gênero *Nopalea* não foi alterado pela pressão de infestação. A alteração observada pode estar relacionada a fatores inerentes ao crescimento e desenvolvimento. Já no gênero *Opuntia* ficou evidente a mudança do perfil fitoquímico à medida que a pressão de infestação aumentou no genótipo susceptível (IPA-100003) e na recuperação do genótipo de resistência intermediária (IPA-200008), que modificou o seu perfil aos 60 dias, mas retornou ao perfil inicial, quando do controle da população de insetos. Possivelmente, o alto teor de esteroides e de saponinas do IPA-200008 aos 60 DAI contribuíram para inibir a ação dos insetos, principalmente pelo poder dissuasivo. O genótipo susceptível não aumentou a intensidade de esteroides ou passou a aumentar tardiamente, quando já não havia chances de recuperação, pois suas reservas de amido já estavam esgotadas (Figura 3.3).

Em todos dos genótipos diminuíram as unidades osídicas e os ácidos graxos insaturados, bem como aumentaram as unidades dos álcoois ou ácidos lineares de cadeia longa com o avançar da infestação, modificando apenas quanto à intensidade. Algumas peculiaridades foram observadas, tais como, sinais fenólicos entre 7,6-7,9 ppm (H-Ar) no IPA-100003 aos 60 dias, sinal 6,40 ppm (-CH=C-) que são os aromáticos, no IPA-200016 ao 0 dia e no IPA-200021 os sinais 2,6, (CH<sub>3</sub>NH-C=O-), 3 (-CH<sub>2</sub>NH-C=O-) e 4 ppm (-CH<sub>2</sub>-O-Ar). Na família Cactaceae é comum se encontrar metabólitos como alcalóides, ácidos graxos de cadeia média, esteroldióis e saponinas. Estes últimos podem agir como deterrentes e os alcalóides, principalmente os isoquinolínicos, podem obstruir os

neurotransmissores, como ocorre nas *Drosophilas* em cactos colunares, ou podem bloquear o metabolismo de esteroides e a assimilação de fitoesteróis ou afetar negativamente a metamorfose (Soto et al., 2014). Recorrente, há a necessidade de se identificar os compostos presentes nestes espectros, principalmente os que possam estimular o comportamento dos insetos como os atraentes ou repelentes da localização, arrestantes ou repelentes da movimentação, iniciantes ou supressores para o início da alimentação e estimulantes ou deterrentes da manutenção da alimentação.

Com os deslocamentos químicos proveniente dos espectros, foi gerada uma matriz 59 x 377, que foi analisada por meio da análise multivariada, a qual é capaz de separar a informação importante da redundante, aplicando-se análises de componentes principais (método exploratório), os quais são utilizados para investigar a distinção ou semelhanças entre amostras de um determinado conjunto. Verificou-se (Figura 3.5) que os dois primeiros componentes principais gerados a partir desta análise apresentaram autovalores maior que um ( $\lambda_i > 1$ , conforme critério de Kaiser) e explicaram 81% das variações das medidas originais, nos quais a variação explicada em CP1 é independente da variação explicada em CP2. Os deslocamentos químicos que mais influenciaram na resposta química da planta durante o ataque foram 0,84, 0,88, 1,20, 1,24 e 1,28 (R-CH<sub>3</sub>), 3,84 e 3,88 (R-CH<sub>2</sub>-X) 4,04 e 4,08 (RO-CH<sub>3</sub>) ppm, os quais influenciaram, principalmente, todos os genótipos aos 60 dias após infestação. Nas observações dos *outliers* (amostras que não se encaixam no modelo), constatou-se que as amostras do IPA-100003 possuíam estas características e que, durante a infestação, os deslocamentos 1,2, 1,24 e 1,28 ppm foram os que mais influenciaram nas respostas a infestação.

[illegible]



Em estudos conduzidos por Alves et al. (2016), avaliando espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos mesmos genótipos utilizados neste estudo, foram observados que três componentes principais foram necessários para explicar 71 e 67% da variação total na estação seca e chuvosa, respectivamente. Ao realizarem o agrupamento, os autores observaram que na estação seca houve a formação de quatro grupos e na chuvosa cinco grupos, destacando que os carboidratos, as substâncias glicosídicas e os compostos fenólicos foram mais expressivos no período chuvoso. Neste trabalho os sinais de  $^1\text{H}$  foram referentes aos lipídeos e a alguns heteroátomos. Os intervalos entre 0,84 a 1,28 ppm são representados pelos  $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  e os intervalos entre 3,28 a 4,08 pelos alifáticos  $\alpha$ -monossustituídos e  $\alpha$ -disustituídos. Possivelmente, existam alguns compostos voláteis que atraiam as cochonilhas para as palmas, sendo que nas susceptíveis, esses compostos sejam mais atraentes, fazendo com que o inseto prefira esta como hospedeira. Alguns monoterpenos podem ter essa ação e na palma forrageira há relatos da presença de alguns como  $\beta$ -linalol, mentol, cis-geraniol, carvone e cis-geranilacetona (Farag et al., 2017), os quais podem estar relacionados com essa atração/repulsão. Destaca-se ainda que os compostos podem ser preferidos de forma hierárquica (Bruce, 2015), o que justificaria em um mesmo ambiente a colonização de genótipos de palma mais susceptíveis. Logo, devem-se identificar os possíveis compostos nesses deslocamentos e quais poderiam estar relacionados com as respostas da interação inseto-planta.

### 3.5 - CONCLUSÕES

O perfil fitoquímico dos cladódios de palma forrados do gênero *Nopalea* não é alterado pela intensidade de infestação por *Dactylopius opuntiae*. Pelo contrário, esse perfil na palma forrageira do gênero *Opuntia* é alterado pela intensidade de infestação por este inseto, em especial os genótipos IPA-200008 e IPA-100003.

Os esteroides, saponinas, taninos e flavonoides podem ser utilizados como indicativos de alterações no perfil metabólico em decorrência do nível de infestação por *Dactylopius opuntiae*. Os ácidos graxos, carboidratos e compostos fenólicos também são

influenciados pela intensidade de infestação por este inseto independente do genótipo dos gêneros *Oputia* e *Nopalea*.

### 3.6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, F. A. L., de Andrade, A. P., Bruno, R. L. A., Silva, M. G. V., de Souza, M. F. V., Pessoa, C., de Oliveira, F. C. E., Filho, S. G. B., dos Santos, D. C. 2016. Genetic diversity and seasonal chemical profile by <sup>1</sup>H NMR and cytotoxic activity in *Opuntia* and *Nopalea* genres. *Journal of Medicinal Plants Research* 10(40):732-747.
- Boiça Júnior, A. L., Souza, B. H. S., Lopes, G. S., Costa, E. N., Moraes, R. F. O., Eduardo, W. I. 2013. Atualidades em resistência de plantas a insetos. p. 207-224 In: Busoli, A. C., Alencar, J. R. D. C. C., Fraga, D. F., Souza, L. A., Souza, B. H. S., Grigolli, J. F. J. (Eds.). *Tópicos em entomologia agrícola – VI*. Jaboticabal: Gráfica Multipress.
- Bruce, T.J.A. 2015. Interplay between insects and plants—dynamic and complex interactions that have coevolved over millions of years but act in milliseconds. *J Exp Bot* 66:455–465.
- Campana M. G., Robles García N. M., Tuross N. 2015. America's red gold: multiple lineages of cultivated cochineal in Mexico. *Ecol. Evol.* 5:607–617.
- Chaieb, I. 2010. Saponins as Insecticides: A Review. *Tunisian Journal of Plant Protection* 5:39–50.
- Cobas, C., Domínguez, S., Larin, N., Iglesias, I., Geada, C., Seoane, F., Sordo, M., Monje, P., Fraga, S., Cobas, C., Peng, J. A. García, M. Goebel and E. Vaz. 2010. MestReNova 6.1.1-6384, Mestrelab Research S.L.
- Costa, R. A. R. 2012. Determinação do grau de pureza de amostra de crack apreendidas no estado da Paraíba por HMNq-<sup>1</sup>H e CLAE-DAD. Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS, 120 f.
- Desoti, V. C., Maldaner, C. L., Carletto, M. S., Heinz, A. A., Coelho, M. S., Piat, D., & Tiuman, T. S. 2011. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, 15(1):3-13.

- Dewick, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 3rd. Chichester: John Wiley & Sons, 2009.549P.
- Díaz M, Castillo L, Díaz CE, Álvarez RG, González-Coloma A, Rossini C. 2014. Differential deterrent activity of natural products isolated from *Allophylus edulis* (Sapindaceae). *Advances in Biological Chemistry* 4:168-179.
- Farag, M. A., Maamounb, A. A., Ehrlich, A., Fahmy, S., Wesjohann, L.A. 2017. Assessment of sensory metabolites distribution in 3 cactus *Opuntia ficus-indica* fruit cultivars using UV fingerprinting and GC/MS profiling techniques. *Food Science and Technology* 80:145-154.
- Garcia-Vallvé S. 2006. Dendro UPGMA: a dendrogram construction utility.<http://genomes.urv.es/UPGMA/> Google Scholar.
- Gullan, P. J., Cranston, P. S. 2007. Os insetos: um resumo de entomologia. 3 ed. São Paulo, Rocca, 440p.
- Gomes, J. B. 2011. Adubação orgânica na produção de palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* (L) Mill.) no cariri paraibano. Dissertação (M.Sc.). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.
- Iulianelli, G.C.V. e Tavares, M.I.B. 2011. Caracterização de diferentes amostras de mandioca por espectroscopia de ressonância magnética nuclear. *Polímeros* 21(2): 131-136.
- Lara, F. M. 1991. Princípios de resistência de plantas a insetos. 2. ed. São Paulo: Ícone. 336 p.
- Lima, G. F. C., Silva, J. G. M., Nobre, F. V., Barreto, H. F. M. 2009. Produção estratégica de alimentos para a pecuária familiar no semiárido: Alternativas para a formulação de rações na própria fazenda. EMPARN, Natal.
- Lopes, E.B., Albuquerque, I.C., Brito, C.H, Batista, J. D. L .2009. Velocidade de infestação de *Dactylopius opuntia* Cockerell,1896 em palma gigante na Paraíba. *Engenharia Ambiental* 6:196-205.
- Marin, R. 1987. Técnicas de colonización y dispersión de la ‘cochinilla del carmín’. *Revista Peruana Entomologia* 30:118-120.

- Matos, F.J.A. 2009. Introdução à fitoquímica experimental. 3. ed. Fortaleza: Ed. UFC. 150p.
- Msaddak, L., Abdelhedi, O., Kridene, A., Rateb, M., Belbahri, L., Ammar, E., Nasri, M., Zouari, N. 2017. *Opuntia ficus-indica* cladodes as a functional ingredient: bioactive compounds profile and their effect on antioxidant quality of bread. *Lipids Health Dis* 16: 32.
- Opitiz, S. E. W., Muller, C. 2009. Plant chemistry and insect sequestration. *Chemoecology* 19:117-154.
- Panis, D.N., Padró, J., Furió-Tarí, P., Tarazona, S., Milla Carmona, P.S., Soto, I.M., Dopazo, H., Conesa, A., Hasson, E. 2016. Transcriptome modulation during host shift is driven by secondary metabolites in desert *Drosophila*. *Mol Ecol*. 25(18):4534-50.
- Pritchard, J., Griffiths, B., Hunt, E.J. 2007. Can the plant-mediated impacts on aphids of elevated CO<sub>2</sub> and drought be predicted. *Glob Chang Biol* 13:1616–1629.
- Ribeiro, C.M., Souza, N.Â. de. 2007. Esquema geral para elucidação de substâncias orgânicas usando métodos espectroscópico e espectrométrico. *Química Nova* 30(4):1026-1031.
- Santos, D. C.; Silva, M. C.; Bubeux Júnior, J. C. B.; Lira, M. A.; Silva, R. M. 2013. Estratégias para uso de cactáceas em zonas semiáridas: novas cultivares e uso sustentável das espécies nativas. *Revista Científica de Produção Animal*, 15(2):111-121.
- Stintzing, F. C., Carle, R. Cactus Stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. 2005. *Molecular Nutrition & Food Research* 49:175-194.
- Soto, I.M., Carreira, V.P., Corio, C., Padrão, J., Soto, E.M., Has-son, E. 2014. Differences in tolerance to host cactus alkaloids in *Drosophila koepferae* and *D. buzzatii*. *PLoS One* 9:e88370.
- Vasconcelos, A. G. V., Lira, M. A., Cavalcanti, V. L. B., Santos, M. V. F., Willadino, L. 2009. Seleção de clones de palma forrageira resistentes à cochonilha-do-carmim (*Dactylopius* sp.). *Revista Brasileira de Zootecnia* 38:827-831.

War, A.R.; Paulraj, M.G.; Ahmad, T.; Buhroo, A.A.; Hussain, B.; Ignacimuthu, S.; Sharma, H.C. 2012. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal. Behav.* 7:1306–1320.

## CAPÍTULO IV

---

**Diversidade genética por RAPD, ITS e ISSR de genótipos de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) com diferentes graus de resistência ao inseto *Dactylopius opuntiae***

**Diversidade genética por RAPD, ITS e ISSR de genótipos de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) com diferentes graus de resistência ao inseto *Dactylopius opuntiae***

**RESUMO**

Objetivou-se avaliar a diversidade genética entre sete indivíduos de palma forrageira, com diferentes graus de resistência ao *Dactylopius opuntiae*, usando os marcadores ITS, RAPD e ISSR. Foram avaliados quatro genótipos de palma forrageira do gênero *Opuntia* (IPA-100003, IPA-200008, IPA-200016 e IPA-200149) e três do gênero *Nopalea* (IPA-100004, IPA-200021 e IPA-200205). O DNA foi extraído, purificado, quantificado e amplificado por PCR, utilizando os marcadores RAPD, ITS e ISSR. O polimorfismo foi analisado como presença (1) e ausência (0) em função das bandas detectadas no gel, construída uma matriz de dissimilaridade e agrupamentos (Ward e Tocher), com validação dos agrupamentos determinado pelo coeficiente correlação cofenética e, por fim, realizou-se uma análise de componentes principais. Dos 26 primers utilizados 24 geraram 890 bandas amplificadas, 206 loci polimórficos e 36 monomórficos. O número de fragmentos variou de 5 (OPG 10) a 12 (OPG 06) para o RAPD, 8 (UBC 842 e UBC 864) a 19 (UBC 808 e UBC 827) para ISSR e 4 para ITS, com uma média de 8 para 9 loci por marcador de RAPD e 11 para 12 loci por marcador de ISSR. Por meio da matriz de dissimilaridade, as distâncias genéticas entre os sete genótipos de palma forrageira variaram entre 0,46 (IPA-100004 e IPA-200021) e 0,65 (IPA-200016 e IPA-200205). No dendrograma, os genótipos foram alocados em dois grupos, separando os genótipos entre *Opuntia* e *Nopalea* e pelo método de Tocher houve a formação de três grupos. O coeficiente de correlação cofenética foi alto e significativo ( $r = 0,80$ ) e na análise dos componentes principais, houve a formação de três grupos. Os genótipos do gênero *Nopalea* estiveram sempre no mesmo grupo, assim como os genótipos IPA-100003 e IPA-200008. Nos métodos de Tocher e de componentes principais o genótipo IPA-200016 ficou isolado, ressaltando que este genótipo do gênero *Opuntia* é considerado resistente ao *D. opuntiae*. Os genótipos IPA-100004 e IPA-200205 do gênero *Nopalea* e IPA-200008 e IPA-200016 do gênero *Opuntia*, são os mais geneticamente dissimilares, o que significa que eles podem

fornecer material genético ligado ao estudo de genótipos promissores com base em caracteres moleculares, o que permite rápidos ganhos genéticos.

**Palavras-chaves:** agrupamento, melhoramento, resistência, variabilidade

**Genetic diversity by RAPD, ITS and ISSR of cactus pear genotypes (*Opuntia* and *Nopalea*) with different degrees of insect resistance *Dactylopius opuntiae***

**ABSTRACT**

The objective of this study was to evaluate a genetic diversity among seven cactus pear with different degrees of resistance to *Dactylopius opuntiae* using ITS, RAPD and ISSR markers. Four genotypes of cactus pear of the genus *Opuntia* (IPA-100003, IPA-200008, IPA-200016 and IPA-200149) and three of the genus *Nopalea* (IPA-100004, IPA-200021 and IPA-200205). DNA was extracted, purified, quantified and amplified by PCR using the RAPD, ITS and ISSR markers. The polymorphism was analyzed as presence (1) and absence (0) as a function of the strains detected without gel, constructed a matrix of dissimilarity and clusters (Ward and Tocher), with validation of the groupings determined by coefficient correlation cophenetic and a principal component analysis was performed. Of the 26 primers used, 24 generated 890 amplified bands, 206 polymorphic loci and 36 monomeric loci. The number of fragments varied from 5 (OPG 10) to 12 (OPG 06) for RAPD, 8 (UBC 842 and UBC 864) at 19 (UBC 808 and UBC 827) for ISSR and 4 for ITS, with a mean of 8 for 9 loci per RAPD marker and 11 for 12 loci per marker of ISSR. The genetic diversity of the seven cactus pear genotypes varied from 0.46 (IPA-100004 to IPA-200021) and 0.65 (IPA-200016 and IPA-200205). In dendrogram, genotypes were allocated in two groups, separating between *Opuntia* and *Nopalea*, by the Tocher method there was a formation of three groups. The cofactor correlation cophenetic was high and significant ( $r = 0.80$ ) and in the principal component analysis, there was a formation of three groups. Genotypes of the genus *Nopalea* not always group, as well as IPA-100003 and IPA -200008. Our methods of Tocher and major components or genotype IPA-200016 formed a group, highlighting the genus of the genus *Opuntia* is considered resistant to *D. opuntiae*. The



genotypes IPA-100004 and IPA-200205 in genus *Nopalea* and IPA-200008 and IPA-200016 in genus *Opuntia*, are the most genetically dissimilar, meaning that they can provide genetic material, linked to the study of promising genotypes based on characters which allows for rapid genetic gains.

**Keywords:** cluster, breeding, resistance, variability

## 4.1 - INTRODUÇÃO

No Nordeste brasileiro o clima predominante é o semiárido, apresentando elevadas temperaturas diurnas e, em alguns locais, baixas temperaturas noturnas, alta radiação solar, baixa umidade do ar e baixa precipitação pluvial, concentrada em três a quatro meses e com médias entre 300-800 mm, o que gera balanço hídrico negativo.

Essa região é a segunda mais populosa no Brasil, com mais de 57 milhões de habitantes (IBGE, 2015), na qual a pecuária tem sido uma das principais aptidões, com criações de bovinos, ovinos e caprinos, utilizando como recurso forrageiro as pastagens nativas, com destaque para os ecossistemas da Caatinga (Andrade et al., 2006; Dubeux Júnior et al., 2013). Todavia, dada a estocasticidade pluvial e aos intensos ciclos de seca, a produção de forragem e, conseqüentemente, a disponibilidade de nutrientes é comprometida, tornando a produtividade animal vulnerável e com baixo desempenho zootécnico (Embrapa, 2011).

A produção de volumosos em quantidade e qualidade deveria ser prioritária, necessitando planejar adequadamente a oferta alimentar, para garantir a sustentabilidade da pecuária. Desta forma, uma das estratégias para o desenvolvimento pecuário em regiões semiáridas é o uso de culturas xerófilas, no qual a palma forrageira se destaca, pois possui alta eficiência na utilização da água, elevada capacidade produtiva de biomassa (Farias et al., 2005; Santos et al., 2006), além de adaptações às condições edafoclimáticas em virtude de mudanças morfológicas e fisiológicas, como o metabolismo ácido das crassuláceas (MAC), presença de espinhos, desenvolvimento radicular superficial com formação de raízes adventícias, caule do tipo cladódio (Sampaio et al., 2005).

Nas últimas décadas, as cactáceas vêm sendo utilizadas nessa região na alimentação animal, principalmente a palma forrageira, que se tornou a base da alimentação de ruminantes, contribuindo no desenvolvimento local. Nutricionalmente, é alto o seu conteúdo de água, minerais, carboidratos solúveis, vitaminas e alta digestibilidade, baixos teores de proteína bruta e alta aceitabilidade (Ferreira et al., 2007).

Uma estimativa antiga relata que a área destinada à produção de palma no Nordeste seja superior a 550.000 ha, com predominância do gênero *Opuntia* (Gigante, Redonda e IPA 20) (Dubeux Júnior et al., 2013; Silva, Oliveira e Souto, 2015). No entanto, acredita-se que hoje essa área seja maior.

Desde os anos 2001, palmais com as variedades Gigante, Redonda e IPA-20, todas do gênero *Opuntia*, vêm sendo dizimados pelo inseto cochonilha-do-carmim (*Dactylopius opuntiae*), o qual possui alta proliferação e disseminação, provocando grandes prejuízos econômicos (Lopes et al., 2009; Vasconcelos et al., 2009). Novas variedades, resistentes e de resistência intermediária, foram recomendadas pelo IPA (Instituto Agrônomo de Pernambuco), tais como Orelha de Elefante Mexicana, Orelha de Elefante Africana, F-08, IPA-Sertânia e F-21. Todavia, ainda são escassos estudos de diversidade genética de palma forrageira que possam contribuir para o melhoramento genético e, conseqüentemente, dispor para o mercado variedades resistentes ou de resistência intermediária e com alta capacidade produtiva sob estresse hídrico.

Os estudos de diversidade genética, além da importância para a conservação e caracterização de germoplasma, permite agrupar os genótipos, facilitando na investigação de uma dada característica pelas diferenças ou semelhanças entre os mesmos para a sua seleção e utilização. Desse modo, a diversidade genética torna-se vantajosa, por não limitar a vulnerabilidade das espécies às pragas e doenças, além de criar novas combinações de genes favoráveis.

Para os estudos de diversidade genética, principalmente quando não se tem a sequência do genoma ou quando os estudos ainda são incipientes, a utilização de marcadores moleculares pode ser rápida e fácil de usar para iniciar a avaliação da diversidade (Velasco-Ramírez et al., 2014).

Nesse contexto, objetivou-se avaliar a diversidade genética entre sete genótipos de palma forrageira, com diferentes graus de resistência ao *Dactylopius opuntiae*, usando os marcadores moleculares ITS, RAPD e ISSR.

## 4.2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1- Local do experimento e material genético

O experimento foi desenvolvido em estufa de vegetação do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (CCA/UFPB) localizada no município de Areia-PB, Microrregião Areia e na Mesorregião do Agreste Paraibano, com altitude variando entre 650 a 1.000 m e coordenadas geográficas de 06° 57' 48" S e 35° 41' 30" W, O clima é do tipo tropical chuvoso com verão seco (CPRM, 2005).

Foram avaliados sete genótipos de palma forrageira, sendo quatro do gênero *Opuntia* (IPA-100003- *Opuntia ficus-indica* Mill, IPA- 200008 - *Opuntia atropes* Rose, IPA- 200149 - *Opuntia larreri* F.A.C. Weber, e IPA 200016 - *Opuntia stricta* Haw) e três genótipos de *Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck (IPA-100004, IPA-200021 e IPA - 200205). O IPA-100003 é considerado susceptível, o IPA- 200008 e IPA-200021 são considerados de resistência intermediária e os demais resistentes aos *Dactylopius Opuntiae* (Tabela 4.1).

Os cladódios para a implantação do estudo foram provenientes do banco de germoplasma do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), localizado no município de Arcoverde-PE. Após a coleta, esses cladódios foram armazenados durante uma semana em lugar seco, arejado e ao abrigo do sol, para que ocorresse a cicatrização do corte. Antes do plantio, todos os cladódios foram higienizados com solução de hipoclorito de sódio a 2% e detergente neutro a 20%. Os cladódios foram cultivados em vasos com capacidade de 12 L, todos preenchidos com areia lavada e esterco de caprino na proporção 10:1 (v/v) e regados a cada 15 dias com 19 mm de água.

Testes preliminares foram realizados para definir o melhor tecido vegetal para ser extraído, utilizando a metodologia proposta por Doyle e Doyle (1987) com modificações. Destes a melhor extração foi obtida com a epiderme de cladódios jovens, por proporcionar menor conteúdo mucilaginoso durante a maceração.

Tabela 4.1-Genótipos de palma forrageira avaliadas com diferentes graus de resistência ao inseto *Dactylopius opuntiae*

<b>Espécies</b>	<b>Acesso</b>	<b>Nome popular</b>	<b>Grau de resistência</b>
<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill	IPA-100003	IPA-20	Susceptível
<i>Opuntia atropes</i> Rose	IPA-200008	F-08	Intermediário
<i>Opuntia strica</i> Haw	IPA-200016	Orelha de Elefante Mexicana	Resistente
<i>Opuntia larreri</i>	IPA-200149	V-19	Resistente
<i>Nopalea cochenillifera</i> Salm-Dyck	IPA-100004	Miúda	Resistente
<i>Nopalea cochenillifera</i> Salm-Dyck	IPA-200021	F-21	Intermediário
<i>Nopalea cochenillifera</i> Salm-Dyck	IPA-200205	IPA-Sertânia	Resistente

As modificações ocorridas no protocolo de Doyle e Doyle (1987) foram a purificação do DNA que ocorreu durante a fase de extração, na qual após a centrifugação do material genético com CIA (clorofórmio:álcool isoamílico) foram pipetados 280 µL do sobrenadante para novos tubos e adicionados 40 µL de RNase a 5,70 µg.ml<sup>-1</sup> e incubados por 10 min a 37 °C. Posteriormente, foram adicionados 28 µL de NaCl e 185µL de isopropanol gelado (-20 graus). A centrifugação ocorreu a 13.400 rpm por 5 min, havendo o descarte de sobrenadante e lavagem, com 1 mL de etanol 70% v/v, repetindo-se esse passo duas vezes. Em seguida, houve uma nova lavagem com 1 mL de etanol absoluto e centrifugação a 13.400 rpm por 2 min. Após o descarte do álcool, o pellet foi seco à temperatura ambiente (30 min) e ressuspendido com 200 µL TE (tampão de extração). Em seguida, foi realizada uma diluição de 1/3, com 20 µL de DNA e 60 µL de TE.

Para se estimar a quantidade e qualidade do DNA, o material foi submetido a um processo de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, utilizando como corante o brometo de etídio e tampão TAE 1X (0,04 M Tris-acetato e 1 mM EDTA) a 100 V. Alíquotas de cada amostra de DNA foram aplicadas aos poços de gel e a concentração das amostras foram estimadas, comparando-se visualmente pela intensidade da fluorescência das bandas de DNA com um padrão conhecido, Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder, e fotografadas sob luz UV em uma câmera de imagem molecular Gel Logic 112 (Carestream, Rochester, NY).

#### **4.2.2 - Análise de ITS-PCR**

As regiões foram amplificadas utilizando os marcadores ITS 1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e TS 4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (Lyra et al., 2015). A amplificação foi conduzida em um termociclador programado para uma desnaturação inicial de 95 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos; anelamento a 62 °C por 1 min; extensão a 72 °C por 2 min e extensão final a 72 °C por 5 min.

Na reação de amplificação das amostras, foram utilizados as concentrações descritas por Ribeiro et al. (2009): 2 µL de DNA; 1 µL de tampão 1X; 0,25 mM de cada DNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 3mM de MgCl<sub>2</sub>; 1µM de cada primers ITS 1 e

ITS 4; 1,25 unidades da enzima Taq polimerase (5 unidades. $\mu\text{L}^{-1}$ ); água ultra pura para completar o volume da reação para 25  $\mu\text{L}$ .

Após a amplificação, 5  $\mu\text{L}$  da reação de PCR e 1  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, por aproximadamente duas horas contendo brometo de etídio (0,5  $\text{ug.mL}^{-1}$ ), a 100 V, em tampão TBE 0,5 X (tris, ácido bórico e EDTA), juntamente com um padrão de peso molecular de 100 pb (pares de base), Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder. Após a corrida, o gel foi visualizado em luz ultravioleta e fotografado com um sistema de imagem Gel Logic 112Pro (Carestream, Rochester, NY).

#### 4.2.3 - Análise de RAPD-PCR

Para as análises de RAPD foram utilizados 13 iniciadores decâmeros: OP06, OPG07, OPG10, OPC11, OPS03, OPG19, OPA02, OPG01, OPG03, OPG13, OPG15, OPG06 e OPM12 (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA). Esses iniciadores foram escolhidos com base no polimorfismo e sua eficiência em estudos de diversidade genética observados em trabalhos anteriores (Mondragon-Jacob et al., 2003; Mergulhão et al., 2012), o quais foram selecionados previamente para palma forrageira.

Foi realizada a reação de amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase-PCR em um volume final de 25  $\mu\text{L}$ , composto de 23  $\mu\text{L}$  de Mix (tampão 1X + 3 mM  $\text{MgCl}_2$  + 200  $\mu\text{M}$  dNTP's + 1  $\mu\text{M}$  do primer + 1 U de DNA Taq polimerase) e 2  $\mu\text{L}$  de DNA genômico (50 ng) da amostra. O ciclo de amplificação foi realizado em um termociclador, conforme Mergulhão et al. (2012), com as seguintes temperaturas: 5 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C (desnaturação do DNA); 1 minuto a 40 °C (pareamento do *primer* ao DNA molde) e 1 minuto a 72 °C (extensão dos *primers*), seguidos de 5 minutos a 72 °C (extensão final dos fragmentos).

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 0,5X (tris, ácido bórico e EDTA) em corrente elétrica de 100 V, por aproximadamente duas horas, corados com brometo de etídio e fotografados usando um sistema de imagem Gel Logic 112Pro (Carestream). Os pesos moleculares dos produtos foram estimados usando um DNA padrão de 100 pb ( Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder).

#### 4.2.4 - Análise ISSR-PCR

Na análise de ISSR foram utilizados 13 iniciadores: UBC01, UBC02, UBC857, UBC808, UBC810, UBC827, UBC830, UBC842, UBC849, UBC855, UBC862, UBC866 e UBC888, os quais foram escolhidos com base no polimorfismo e sua eficiência em estudos de diversidade genética para palma forrageira (Alves et al., 2009; Mergulhão et al., 2012).

Foi realizada a reação de amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase-PCR em um volume final de 25 µL, composto de 23 µL de Mix (tampão 1X + 3 mM MgCl<sub>2</sub> + 200 µM dNTP's + 1 µM do primer + 1 U de DNA Taq polimerase) e 2 µL de DNA genômico (50 ng) da amostra. O ciclo de amplificação foi realizado em um termociclador, conforme Mergulhão et al. (2012), com as seguintes temperaturas: 5 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C (desnaturação do DNA); 45 segundos a 52 °C (pareamento do *primer* ao DNA molde) e 2 minutos a 72 °C (extensão dos *primers*), seguidos de 5 minutos a 72 °C (extensão final dos fragmentos).

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 0,5 X (tris, ácido bórico e EDTA) em corrente elétrica de 100 V, por aproximadamente duas horas, corados com brometo de etídio e fotografados usando um sistema de imagem Gel Logic 112Pro (Carestream). Os pesos moleculares dos produtos foram estimados usando um DNA padrão de 100 pb (Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder).

#### 4.2.5- Análise dos dados

O polimorfismo foi analisado como presença (1) e ausência (0) em função das bandas detectadas no gel. Após as leituras da banda de gel, foi construída uma matriz binária. Para as medidas de dissimilaridade dos dados, as distâncias genéticas entre os indivíduos foram estimadas com base na distância binária de Sokal. Os agrupamentos hierárquicos a partir da matriz de distâncias genéticas foram obtidos pelos métodos de Ward (1963), que se baseia na análise de variância, utilizando as somas de quadrados (SQ) dentre e entre grupos.

Para a definição do número de grupos, o corte do dendrograma foi realizado adotando-se o critério proposto por Mojena (1977), que se baseia no tamanho relativo dos níveis de fusão (distâncias) no dendrograma, tendo por finalidade determinar o

número de grupos que otimize a qualidade do ajuste do agrupamento aos dados. A análise de *bootstrap* foi realizada para verificar e dar suporte estatístico aos nós internos dos dendrogramas.

A validação dos agrupamentos foi determinada por meio do cálculo do coeficiente de correlação cofenético (Sokal e Rohlf, 1962), que é fundamentado na semelhança entre a matriz de distâncias obtidas pelas medidas de parecença e a matriz de distâncias originais, e sua significância testada pelo teste de t de student a 5% de probabilidade.

Para o agrupamento não-hierárquico, utilizou-se o procedimento de otimização de Tocher, que produz apenas uma solução de agrupamento para um conjunto de ponto de partida, onde o processo de agrupamento é sequencial e não simultâneo, não existindo influência dos indivíduos já agrupados.

Realizou-se uma análise de componentes principais, que se baseou na matriz de distâncias genéticas, organizando os indivíduos em uma trama de dispersão tridimensional. Todas as análises foram realizadas usando o software Genes (Cruz, 2016).

#### **4.3 - RESULTADOS**

Na análise dos marcadores (RAPD, ITS e ISSR) dos 26 primers utilizados, 24 geraram 890 bandas amplificadas, 206 loci polimórficos e 36 monomórficos. O número de fragmentos variou de 5 (OPG 10 ) a 12 (OPG 06) para o RAPD, 8 (UBC 842 e UBC 864) a 19 (UBC 808 e UBC 827) para ISSR e 4 para ITS, com uma média entre 8 e 9 loci por marcador de RAPD e 11 para 12 loci por marcador de ISSR (Figura 4.1), resultando em 100% de polimorfismo nos loci nos sete primers de RAPD (Tabela 4.2) e quatro nos primers de ISSR (Tabela 4.3). Os primers OPG 01 e UBC 888 não amplificaram nenhum fragmento de DNA (Tabela 4.2 e Tabela 4.3), indicando o não anelamento do iniciador à fita-molde de DNA.



Figura 4.1-Produto da amplificação gerada com marcadores de RAPD (OPG 15), ISSR (UBC 810) e ITS (1 e 4) em populações de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) com diferentes graus de resistência ao *Dactylopius opuntiae*. Padrão utilizado, Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder. 03 = IPA-100003, 04 = IPA-100004, 08 = IPA-200008, 16 = IPA-200016, 21 = IPA-200021, 149 = IPA-200149, 205 = IPA-200205, bp = pares de base.

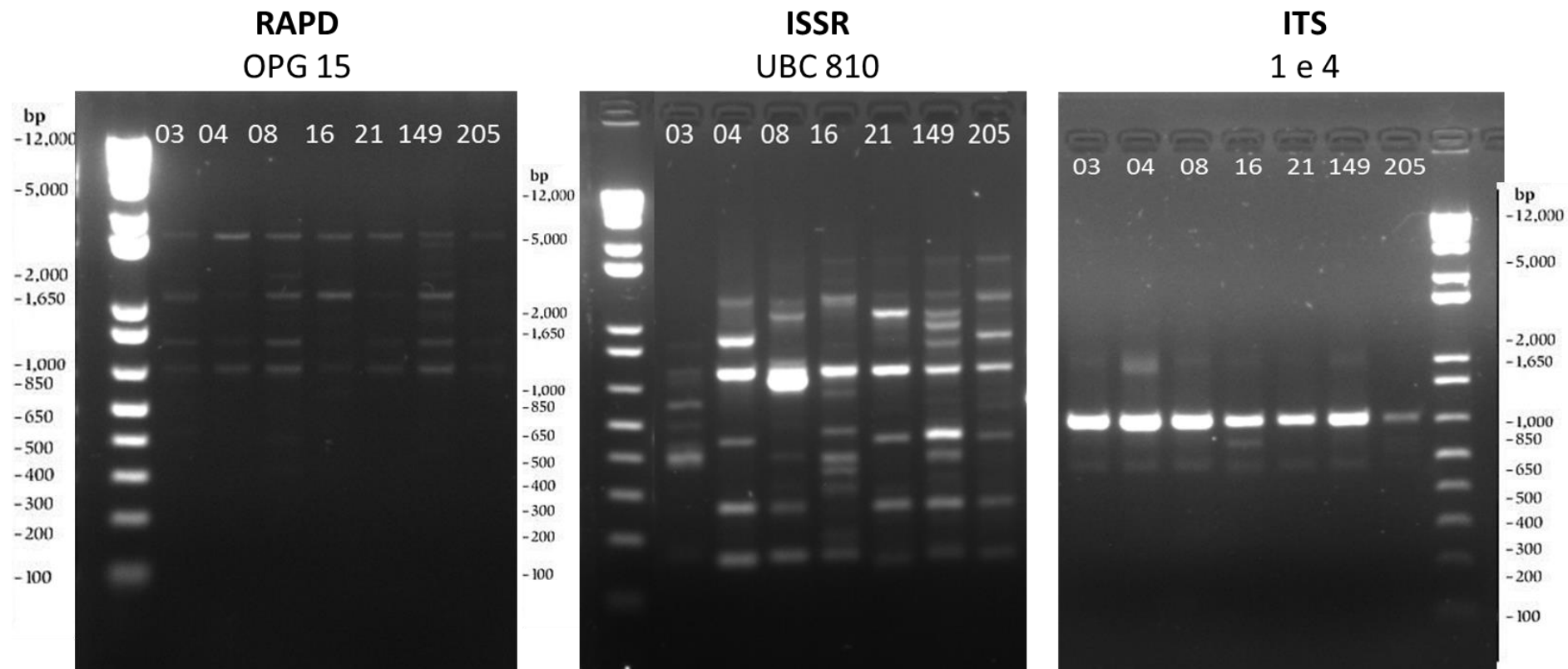


Tabela 4.2-Lista de marcadores de RAPD utilizados na análise da variabilidade genética em populações de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) com diferentes graus de resistência ao *Dactylopius opuntiae*

<b>Tipo de marcador</b>	<b>Primer</b>	<b>5' → 3' Sequência</b>	<b>Total de bandas amplificadas (n°)</b>	<b>Loci polimórficos (n°)</b>	<b>Loci monomórficos (n°)</b>	<b>Polimorfismo (%)</b>
RAPD	OP 06	TCG CCC CAT T	20	7	0	100
RAPD	OPG 07	GAA CCT GCG G	23	6	0	100
RAPD	OPG 10	AGG GCC GTC T	42	7	3	70
RAPD	OPC 11	AAA GCT GCG G	25	8	0	100
RAPD	OPS 03	CAG AGG TCC C	20	5	0	100
RAPD	OPG 19	GTC AGG GGC A	24	6	0	100
RAPD	OPA 02	TGC CGA GCT G	36	8	2	80
RAPD	OPG 01	CTA CGG AGG A	0	0	0	0
RAPD	OPG 03	GAG CCC TCC A	27	7	1	87,5
RAPD	OPG 13	CTC TCC GCC A	25	9	0	100
RAPD	OPG 15	ACT GGG ACT C	25	4	2	66,7
RAPD	OPG 06	GAA CGG ACT C	43	10	2	83,3
RAPD	OPM 12	GGG ACG TTG G	45	11	0	100
TOTAL			355	88	10	-

Tabela 4.3-Lista de marcadores de ISSR utilizados na análise da variabilidade genética em populações de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) com diferentes graus de resistência ao *Dactylopius opuntiae*

Primer	5' → 3' Sequência	Total de bandas amplificadas (n°)	Loci polimórficos (n°)	Loci monomórficos (n°)	Polimorfismo (%)
UBC 01	ACA CAC ACA CAC ACA CT	33	7	2	77,8
UBC 02	GAG AGA GAG AGA GAG AT	37	7	2	77,8
UBC 857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	27	10	0	100
UBC 808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	68	16	3	84,2
UBC 810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	57	14	3	82,4
UBC 827	AC AC AC AC AC AC AC AC G	58	19	0	100
UBC 830	TG TG TG TG TG TG TG TG G	31	13	0	100
UBC 842	GA GA GA GA GA GA GA GA YG	39	6	2	75
UBC 849	GT GT GT GT GT GT GT GT YA	23	10	0	100
UBC 855	AC AC AC AC AC AC AC AC YT	49	6	4	60
UBC 862	AGC AGC AGC AGC AGC AGC	38	5	3	62,5
UBC 866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC	51	2	6	25
UBC 888	CA CA CA CA CA CA CA	0	0	0	0
TOTAL		511	115	25	-

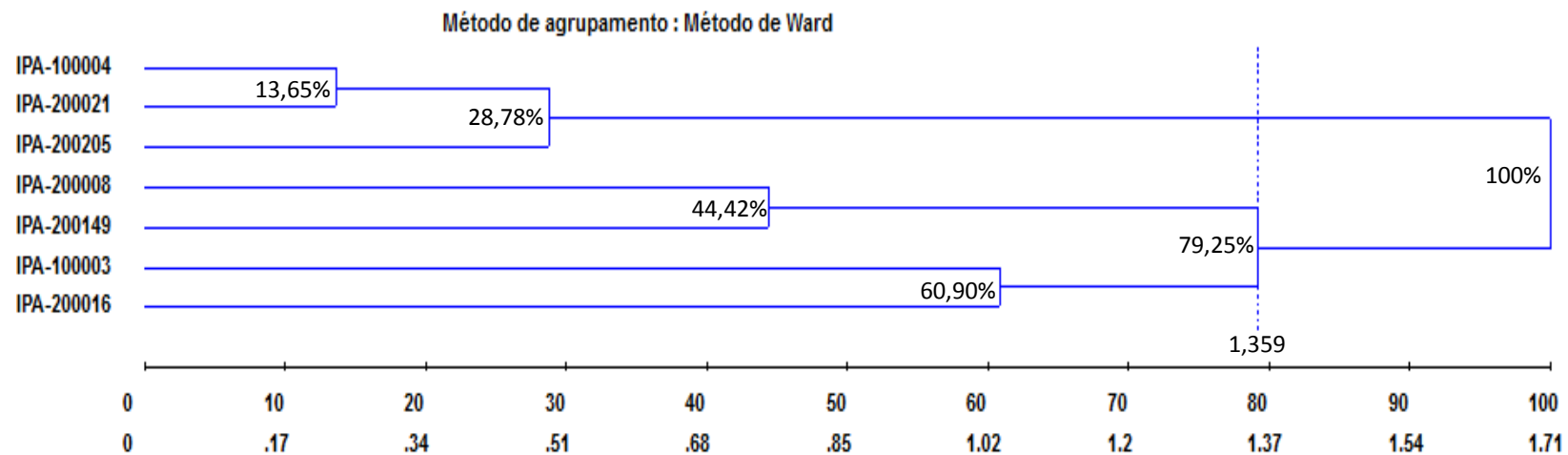
Por meio da matriz de dissimilaridade (Tabela 4.4), utilizou-se do método hierárquico de agrupamento de Ward (1963), para desenvolver o dendrograma. As distâncias genéticas entre os sete genótipos de palma forrageira variaram entre 0,46 (IPA-100004 e IPA-200021) e 0,65 (IPA-200016 e IPA-200205); O valor médio da dissimilaridade genética observado nesta população foi de 0,57 (57%).

Tabela 4.4-Matriz de dissimilaridade genética em populações de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) com diferentes graus de resistência ao *Dactylopius opuntiae*

Genótipo	IPA-100003	IPA-100004	IPA-200008	IPA-200016	IPA-200021	IPA-200149	IPA-200205
IPA-100003	0	0,54969	0,56262	0,56581	0,57213	0,58764	0,61749
IPA-100004		0	0,54969	0,64317	0,46843	0,57527	0,52969
IPA-200008			0	0,59675	0,55295	0,53644	0,62903
IPA-200016				0	0,60573	0,61457	0,65426
IPA-200021					0	0,56581	0,48354
IPA-200149						0	0,54969
IPA-200205							0

Os genótipos foram alocados em dois grupos (Figura 4.2). O ponto de corte (79 %) foi definido de acordo com os critérios estabelecidos por Mojena (1977). Observou-se, coincidentemente, que os dois grupos separam os genótipos por gênero, *Nopalea*: IPA-100004, IPA-200021 e IPA-200205, *Opuntia*: IPA-100003, IPA-200008, IPA-200016 e IPA-200149. No primeiro grupo, a maior semelhança foi observada entre os genótipos IPA-100004 e IPA-200021 e no segundo grupo entre os genótipos IPA-200008 e IPA-200149. Verificou-se ainda que os indivíduos do primeiro grupo foram mais semelhantes do que os do segundo grupo. Os menores valores de *bootstrap* foram 13,65 (IPA-100004 e IPA-200021) e 28,78% (IPA-100004 e IPA-200205) e os maiores de 79,25 (IPA-200008 e IPA-100003) e 100% (IPA-100003 e IPA-100004).

Figura 4.2-Dendrograma construído pelo método de agrupamento hierárquico de Ward em populações de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) com diferentes graus de resistência ao *Dactylopius opuntiae*. Valores do “bootstrap” em percentagem para 100 repetições.



A análise de agrupamento pelo método de otimização de Tocher possibilitou a formação de três grupos (Tabela 4.5). O grupo I englobou o maior número de genótipos, totalizando cinco, nos quais todos do gênero *Nopalea* estavam neste grupo. No grupo II estavam presentes os genótipos IPA-100003 e IPA-200008 e no grupo III apenas o genótipo IPA-200016.

Tabela 4.5-Agrupamento de otimização pelo método de Tocher em populações de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) com diferentes graus de resistência ao *Dactylopius opuntiae*

Grupos	Genótipos
I	IPA-100004, IPA-200021, IPA-200205, IPA-200149
II	IPA-100003 e IPA-200008
III	IPA-200016

O coeficiente de correlação cofenética (Tabela 4.6), obtido a partir da matriz de distância genética e da matriz de distância cofenética, do dendrograma, foi alto e significativo ( $r = 0,80$ ), demonstrando a consistência dos aglomerados, uma vez que coeficientes de correlação cofenética inferiores a 0,7 indicam a inadequação do método de agrupamento (Rohlf, 1970). A distorção foi de 10,04% e o estresse de 7,10%, ambos considerados bons valores, de acordo com a escala de Kruskal (1964), pois indica haver boa concordância entre a matriz de dissimilaridade e a de agrupamento, confirmando a boa representação da matriz de dissimilaridade na forma do dendrograma.

Tabela 4.6-Coeficiente de correlação cofenética entre a matriz de distância e o método de cluster, gerado a partir da análise da diversidade genética em populações de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) com diferentes graus de resistência ao *Dactylopius opuntiae*

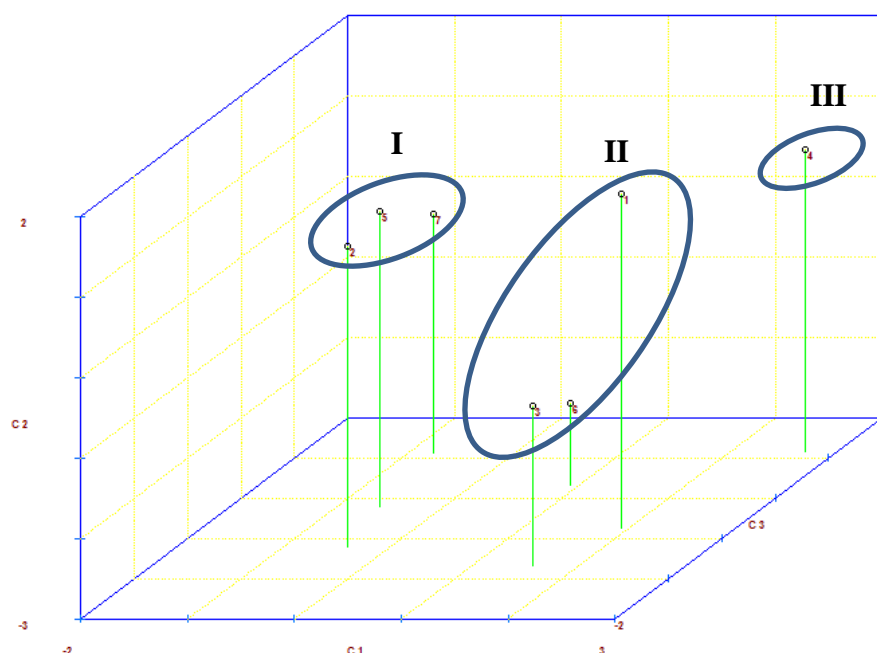
Correlação cofenética	Graus de liberdade	t-valor	Distorção (%)	Estresse (%)
0,80**	19	5,8**	10,04	7,10

\*\* Significativo em  $P \leq 0,01$ .

A distribuição tridimensional de genótipos de palma forrageira através das análises de componentes principais, também evidencia a diversidade existente nesta população (Figura 4.3). Houve a formação de três grupos, no primeiro, grupo I ficaram

agrupados todos os genótipos do gênero *Nopalea*; no grupo II os genótipos IPA-100003, IPA-200008 e IPA-200149 e no grupo III apenas o genótipo IPA-200016.

Figura 4.3-Análise de componentes principais em populações de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) com diferentes graus de resistência ao *Dactylopius opuntiae*. Grupo I = IPA-100004(2), IPA-200021(5), IPA-200205(7), Grupo II = IPA-100003(1), IPA-200008(3) e IPA-200149(6), Grupo III = IPA-200016(4).



Estes resultados corroboram os obtidos na análise de agrupamento de Ward e de Tocher. Os genótipos do gênero *Nopalea* estiveram sempre no mesmo grupo, assim como os genótipos IPA-100003 e IPA-200008. Nos métodos de Tocher e de componentes principais o genótipo IPA-200016 ficou isolado, ressaltando-se ser este genótipo do gênero *Opuntia* considerado resistente ao *D. opuntiae*.

#### 4.4 - DISCUSSÃO

A importância de utilizar os três marcadores para a averiguação da diversidade simultaneamente, se dá por estes estarem associados a vários traços agronômicos, principalmente aqueles relacionados à resistência a pragas e doenças, o que aumentaria a eficiência e a precisão na seleção de genótipos mais desejáveis. O ITS, por exemplo,

foi muito eficiente para investigar as espécies e examinar o nível do gênero cactos em estudo conduzido por Lyra et al. (2015). Neste trabalho o polimorfismo com marcadores de ITS foi de 75% (3 loci polimórficos e 1 loci monomórfico).

A alta diversidade genética foi evidente com os marcadores de RAPD (90,62% de polimorfismo) com destaque para os primers OPM 12 e o OPG 06, que apresentaram maior número de loci polimórficos (11 e 10), com polimorfismo de 100 e 83,3%, respectivamente. Os primers de RADP OPG 10, OPG1 e OPG 15 e os primer ISSR UBC 855, UBC 862, UBC 866 e UBC 888 apresentaram baixo ou nenhum polimorfismo, não sendo adequados para a avaliação da diversidade em palma forrageira (Tabelas 4.2 e 4.3).

Em estudos conduzidos por Alves et al. (2009) e Mergulhão et al. (2012), em diversidade de palma forrageira, foi verificado que o primer UBC 857 gerou o menor número de loci polimórficos, quando comparado com os demais primers. Neste trabalho, o número de loci para o mesmo primer foi o mesmo (10), com 100% de polimorfismo, porém o número loci foi menor no primer UBC 866, que apresentou 2 loci e apenas 25% de polimorfismo. O número de bandas amplificadas foi menor no primer UBC 849 e maior no UBC 808, os quais apresentaram 100 e 84,2 % de polimorfismo, respectivamente, com tamanho de bandas que variaram entre 200 a 3000 pares de bases. Mergulhão et al. (2012) observaram que o menor número de bandas foi gerado pelos primers UBC 01 e UBC 857. Destaca-se que número e o tamanho de fragmentos amplificados, normalmente são determinados pela espécie, pelo primer utilizado e pelas condições de amplificações (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Quanto mais polimórficos mais confiáveis serão as estimativas das relações genéticas entre os genótipos, reforçando a importância do número de loci e sua cobertura de todo o genoma.

Geralmente, os primers com as repetições AG, GA, CT, AC, CA são mais polimórficos que os primers com tri ou tetra nucleotídeos repetidos (Wang et al.,1998). Neste trabalho verificou-se que os primer de ISSR geram o menor polimorfismo (71,22%) quando comparados com RAPD (90, 62%) e ITS (75%), nos quais a maior parte do polimorfismo gerado no ISSR é proveniente dos primers que continham repetições AG, GA e AC. Todavia, era esperado que os marcadores ISSR apresentassem maiores variações alélicas do que o RAPD, como verificado em estudo conduzido por



Kharrassi et al. (2017) com acessos do gênero *Opuntia*, porém Guasmi et al. (2012), estudando cevada (*Hordeum vulgare* L.) e Valadez-Moctezuma et al (2014), estudando *Opuntia*, sugeriram que os marcadores RAPD eram superiores aos marcadores ISSR por revelarem bandas mais informativas em uma única amplificação, pelos maiores valores relativos de polimorfismo, pelo poder de resolução, conteúdo de informação polimórfica e pelo índice do marcador.

A grande variação no número de fragmentos em marcadores de RAPD pode ser atribuída às diferenças nos sítios de ligação ao longo do genoma dos genótipos (Saleh, 2011), visto que a eficiência de uma técnica de marcador molecular depende da quantidade de polimorfismo, que pode ser detectado no conjunto de acessos investigados. As condições de PCR foram bem definidas, o que pode ter contribuído para a alta reprodutibilidade para os marcadores RAPD. Todos os 25 marcadores utilizados neste estudo produziram perfis de amplificação consistentes e reproduzíveis, considerando-os adequados para estudos de diversidade genética.

A análise de agrupamento identificou grupos de genótipos similares após a estimativa de uma matriz de dissimilaridade. Os resultados revelaram boa dissimilaridade genética entre os genótipos avaliados, que aliados a respostas morfológicas ou bioquímicas durante a infestação com o *D. opuntiae*, podem fornecer informações úteis sobre a variação e classificação dos genótipos quanto aos diferentes graus de resistência. Neste trabalho, o índice de dissimilaridade médio foi de 0,61, considerando uma boa dissimilaridade. Estudos em acesso de palma do gênero *Opuntia* (40 acessos e 12 espécies) foram verificados por Valadez-Moctezuma et al. (2014), utilizando separadamente dois tipos de marcadores (RAPD e ISSR), averiguando grande variação genética, com distâncias de 0,284 e 0,941 para RAPD e 0,515 e 0,986 para ISSR.

Na presente investigação, o dendrograma baseado nos três tipos de marcadores agrupou significativamente os genótipos por gênero. Isso foi consistente com a correlação ( $r=0,65$ ) das matrizes de dissimilaridade e cofenética ( $r=0,80$ ), o que demonstra a precisão e concordância das informações geradas. Verificou-se a formação de três clados, os quais podem ocorrer em virtude da alta frequência de mutações naturais que ocorrem no tempo e no espaço, comuns na reprodução assexuada e no endemismo, em que a palma forrageira apresenta alta plasticidade fenotípica e bases

epigenéticas (Valadez-Moctezuma et al., 2014), nos quais a expressão de alguns genes passam a ser mais requisitados em detrimento de outros. Os dendrogramas gerados por marcadores ISSR podem concordar melhor com a genealogia e o pedigree, ou com o número de cromossomos e os de RAPD com a distribuição geográfica (Guasmi et al., 2012). Neste estudo os marcadores ISSR foram mais pontuais e conservadores podendo inferir que os genótipos pertencem ao mesmo grupo genômico e com a possibilidade de apresentar a mesma origem. Os menores valores de *bootstrap* demonstram que esses materiais possuem entre si maior proximidade genética, a precisão de 100% separou em dois grupos principais.

A população em estudo apresentou diversidade genética de grande relevância para as práticas de seleção e cruzamentos de materiais potenciais para encontrar marcadores moleculares associados com características de expressão genética, podendo ser utilizadas para a produção de genótipos mais resistentes ao inseto *D. opuntiae*, no qual os pais mais geneticamente divergentes, IPA-100004 e IPA-200205 no gênero *Nopalea* e IPA-200008 e IPA-200016 no gênero *Opuntia*, devem ser considerados como base. Este fato torna esses genótipos importantes, pois poderá resultar indivíduos com grande habilidade para responder ao ataque do inseto.

Na otimização de Tocher, no qual o objetivo é alcançar uma partição dos indivíduos que maximize ou minimize alguma medida pré-definida, se baseia na formação de grupos cujas distâncias dentro dos grupos sejam menores que as distâncias entre grupos (Cruz et al., 2011, Cruz; Carneiro; Regazzi, 2014). A análise de componentes principais resume o padrão de conservação entre as variáveis, agrupando-as, sendo cada componente principal uma combinação linear das variáveis originais (Cruz et al., 2004). A diversidade nos genótipos estudados é evidenciada na distribuição tridimensional (Figura 4.4), com formação de três grupos. Esses dados, embora não totalmente, relacionam-se com aqueles obtidos nos métodos agrupamento de Ward e Tocher, no qual os genótipos do gênero *Nopalea* permaneceram no mesmo grupo e, o genótipo IPA-200016 tendeu ao isolamento em todas as técnicas de agrupamento utilizadas.

As plantas com propriedades desejáveis que, no caso em estudo, é a resistência ao inseto *Dactylopius opuntiae*, geneticamente divergentes na população, devem ser selecionadas para o melhoramento genético, sendo essencial que a variabilidade

genética esteja presente entre indivíduos da mesma espécie, entre grupos ou, até mesmo, entre diferentes espécies do mesmo gênero. Desta forma, conhecer a variabilidade genética existente na população de palma forrageira pode contribuir para o desenvolvimento de variedades mais resistentes, uma vez que na coevolução, as mutações genéticas são frequentes e, assim, os insetos podem superar a resistência.

As plantas desenvolveram estratégias para se adaptar às ações bióticas e abióticas por meio de mecanismos bioquímicos e moleculares, exibindo respostas de defesa a curto e longo prazo (Gachomo et al., 2003). Assim, torna-se necessário a investigação de genes envolvidos nas respostas de defesa, os quais devem ser identificados, clonados e estudados detalhadamente, uma vez que as plantas respondem por danos causados por insetos com a indução de vários genes, no qual um grupo mais restrito de genes, que são sensíveis à estimulação de insetos, inicia as respostas à interação inseto-planta (Engelberth, 2012). A interação do *D. opuntiae* com a palma foi verificada por Mergulhão et al. (2012b), que isolaram os fragmentos de genes diferencialmente expressos durante a interação. Três sequências exibiram alta similaridade com a sequência de aminoácidos e 16 sequências não foram relacionadas com funções conhecidas. Os fragmentos de cDNA de *Opuntia* 6 (500 pb) estão relacionados ao gene do fator 7a da resposta à auxina, o *Opuntia* 12 (750pb) codifica a desaturase de ácidos graxos e o *Opuntia* 15 (650 pb) é codificado pelo gene da peroxidase do ascorbato (APX).

Sabendo-se dos genes responsáveis pela resposta de defesa durante a interação *D. opuntiae* com a palma, a transgenia pode ser aplicada. Trabalhos como os de Silos-Espino et al. (2006), Cruz et al. (2009) e Shedbalkar et al. (2010) em palma forrageira demonstram que esta tecnologia pode ser útil para a introdução de vários genes importantes, permitindo o desenvolvimento de um sistema de seleção altamente eficiente.

A utilização de marcadores moleculares baseados na reação em cadeia de polimerase (PCR), como os marcadores RAPD (Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso), ITS (espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal nuclear) e ISSR (região interna de sequências simples repetidas) aprimorou os estudos de diversidade genética de vários organismos, permitindo estudos de variação genética intraespecífica e observação de mudanças no genoma, seja pela exclusão ou inserção, que possa levar ao

polimorfismo (Poyraz, 2016), pois esses possibilitam a marcação de diferentes alelos com um marcador molecular (Mergulhão et al., 2012). Esses marcadores são úteis em estudos de diversidade genética, filogenia, marcação de genes, mapeamento do genoma e biologia evolutiva.

#### 4.5 - CONCLUSÕES

Os marcadores moleculares permitem estudar a variabilidade genética entre os genótipos de palma forrageira com confiabilidade para a caracterização e diferenciação de genótipos de palma forrageira.

Os genótipos IPA-100004 e IPA-200205 no gênero *Nopalea* e IPA-200008 e IPA-200016 no gênero *Opuntia*, são mais geneticamente dissimilares e podem fornecer material genético ligado ao estudo de genótipos promissores.

#### 4.6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, T. S, Vanusa, S. M, Almeida C. M. A., Oliveira, J. A. D, C. dos Santos, Farias, I., Tenório, S. D. VM, D Costa A.F. 2009. Genetic diversity in cactus clones using ISSR markers. *Acta Hort* 811:55–58.
- Andrade, A.P., Souza, E.S., Silva, D.S., Silva, I.F., Lima, J.R. S. 2006. Produção animal no bioma caatinga: Paradigmas dos “pulsos-reservas”. *Revista Brasileira de Zootecnia* 35:138-155.
- CPRM - Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais. 2015. Diagnóstico do município de Areia, estado da Paraíba. Recife: CPRM/PRODEEM. Disponível em:<[http://rigeo.cprm.gov.br/xmlui/bitstream/handle/doc/15823/Rel\\_Areia.pdf?sequence=1](http://rigeo.cprm.gov.br/xmlui/bitstream/handle/doc/15823/Rel_Areia.pdf?sequence=1)>. Acesso em: 02/02/2018.
- Cruz, A.R.R., Soares, E.L., Campos, F.A.P., Aragao, F.J.L., 2009. Biolistic-mediated genetic transformation of prickly-pear cactus (*Opuntia ficus-indica* Mill.). *Acta Hort.* 811:255–257.
- Cruz, C. D.; Ferreira, F. M.; Pessoni, L. A. 2011. *Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética*. Visconde do Rio Branco: Ed. Suprema, 620p.

- Cruz, C.D. 2016. Genes software-extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. *Acta Sci. Agron.* 38: 547-552.
- Cruz, C.D.; Carneiro, P.C.S.; Regazzi, A. J. 2014. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 3. ed. Viçosa: Ed UFV, v.2, 668p.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19:11-15.
- Dubeux Júnior, J.C.B., Santos, M.V.F., Cavalcante, M., Santos, D.C. 2013. Potencial da palma forrageira na América do Sul. *Cactusnet Newsletter* 13:29-40.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2011. Semiárido. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/sistema/semi%C3%A1rido/importancia.html>> . Acesso em: 10 dez. 2015.
- Engelberth J, Contreras CF, Viswanathan S., 2012. Transcriptional Analysis of Distant Signaling Induced by Insect Elicitors and Mechanical Wounding in *Zea mays*. *PLoS ONE* 7(4):1-11.
- Farias, I., Santos, D.C., Dubeux-Júnior, J.C.B. 2005. Estabelecimento e manejo da palma forrageira. p.105-128. In: MENEZES, R.S.C., SIMÕES, D.A., SAMPAIO, E.V.S.B. A palma no nordeste do Brasil: conhecimento atual e novas perspectivas de uso. Recife: ed. Universitária da UFRPE.
- Ferreira, M. A.; Pessoa, R. A. S.; Bispo, S. V. 2007. Otimização de dietas a base de palma forrageira e outras alternativas de suplementação para regiões semi-áridas. *Simpósio De Produção de Gado de Corte*, 6, 241-266.
- Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220.
- Gachomo, E. W., Shonukan, O. O., and Kotchoni, S. O. 2003. The molecular initiation and subsequent acquisition of disease resistance in plants. *Afr. J. Biotechnol.* 2:26-32.
- Guasmi, F., Elfalleh, W., Hannachi, H., Fères, K., Touil, L., Marzougui, N., Triki, T. And Ferchichi, A. 2012. The Use of ISSR and RAPD Markers for Genetic Diversity among South Tunisian Barley, *International Scholarly Research Network Agronomy*, (1):1-10.

- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística «Estimativas da População Residente nos Municípios Brasileiros» 2015. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 1 de julho de 2015. Consultado em 24 de setembro de 2015.
- Kharrassi Y, Mazri M. A, Sedra M. H, Mabrouk A, Nasser B, El Mzouri E. 2017. Characterization of Genetic Diversity of Cactus Species (*Opuntia* Spp.) in Morocco by Morphological Traits and Molecular Markers. *Curr Agri Res*,5(2).
- Kruskal, J. 1964. Multidimensional scaling by optimizing goodness-of-fit to a nonmetric hypothesis. *Psychometrika*, (29):1–28.
- Lopes, E.B., Albuquerque, I.C., Brito, C.H., Batista, J. D. L. 2009. Velocidade de Infestação de *Dactylopius opuntia* Cockerell,1896 em Palma Gigante na Paraíba. *Engenharia Ambiental* 6:196-205.
- Lyra, M.C.C.P., da Silva, M.L.R.B, Mergulhão, A.C.E.S., Mondragon-Jacobo, C. Martínez-Romero, E. 2015. Molecular studies of forage prickly-pear cactus from the semiarid of Pernambuco State-Brazil. *J Appl Biol Biot* 3:1–5.
- Mergulhão, A. C. E. S.; Rito, K. F., Cordeiro, D. S., Silva, M. L. R. B., Lyra, M. C. C. P., Silva, M. V. 2012. Marcadores moleculares para detecção de variabilidade genética em variedades de palma forrageira. *Pesquisa Agropecuária Pernambucana*, 17(1):78-82.
- Mergulhão, A. C. E. S.; Rito, K. F.; Almeida, M. A. A.; Amaral, D. J.; Ribeiro, M. L. Silva, M.V. 2012b. Identification of genes expressed during the interaction between prickly pear cactus and carmine cochineal by differential display-RT-PCR. *Agricultural Science Research Journals*, 2 (12):648-652.
- Mojena, R. 1977. Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. *Comput. J.* 20: 359-363. <https://doi.org/10.1093/comjnl/20.4.359>.
- Mondragón-Jacobo, C. 2003. Molecular characterization using RAPDs of a cactus (*Opuntia* spp. Cactaceae) collection from central México as a basis for plant breeding. *Rev Chap Ser Hortic* 9(1):97–114.
- Poyraz, I. 2016. Comparison of ITS, RAPD and ISSR from DNA-based genetic diversity techniques. *C R Biol*, 339(5–6): 171-178.
- Ribeiro, D. C., Bogo, A., Dantas, A. C., Gomes, E. A., Coelho, C. M. M., Guidolin, A. F. 2009. Comparação das técnicas de PCR-RFLP e sequenciamento de região

- ITS-rDNA para análise filogenética de isolados de *Colletotrichum* spp. Revista de Ciências Agroveterinárias, 8(1):43-52.
- Rohlf, F.J. 1970. Adaptative hierarchical clustering schemes. Systematic Zoology, 19(1):58-82.
- Saleh B. 2011. Efficiency of RAPD and ISSR markers in assessing genetic variation in *Arthrocnemum Machrostachyum* (Chenopodiaceae). Braz. Archive Biol. Tech. 54: 859-866.
- Sampaio, E. V. S. B. 2005. Fisiologia da palma. In: Menezes, R. S. C.; Simões, D. A.; Sampaio, E. V. S. B. A palma no nordeste do Brasil: conhecimento atual e novas perspectivas de uso. 2 ed. Editora Universitária da UFPE. Recife. v. 2, p.43-63.
- Santos, D.C., Farias, I., Lira, M.A., Santos, M.V.F., Arruda, G.P., Coelho, R.S.B., Dias, F.M., Melo, J.N. 2006. Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) em Pernambuco. Recife: IPA, 48p. (IPA. Documento, 30).
- Shedbalkar, U.U., Adki, V.S., Jadhav, J.P., Bapat, V.A., 2010. *Opuntia* and other cacti: applications and biotechnological insights. Tropical Plant Biology 3, 136–150.
- Silos-Espino H, Valdez-Ortiz A, Rascón-Cruz Q, Rodríguez-Salazar E, Paredes-López O. 2006. Genetic transformation of pricklypear cactus (*Opuntia ficus-indica*) by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Tissue Organ Cult 86:397–403.
- Silva, A. A. G., de Oliveira, F. T., Souto, J. 2015. Zoneamento agrícola de risco climático da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill) para o estado de Sergipe. Embrapa Tabuleiros Costeiros-Comunicado Técnico (INFOTECA-E).
- Sokal, R.R.; Rohlf, F.J. 1962. The comparison of dendrograms by objective methods. Taxon, 11(1):30-40.
- Valadez-Moctezuma E, Samah S, Luna-Paez A. Genetic diversity of *Opuntia* spp. 2014. Varieties assessed by classical marker tools (RAPD and ISSR). Plant Syst. Evol. 1-11.
- Vasconcelos, A. G. V., Lira, M. A., Cavalcanti, V. L. B., Santos, M. V. F., Willadino, L. 2009. Seleção de clones de palma forrageira resistentes à cochonilha-do-carmim (*Dactylopius* sp.). Revista Brasileira de Zootecnia 38:827-831.
- Velasco-Ramírez AP, Torres-Morán MI, Molina-Moret S, Sánchez-González JJ, et al. 2014. Efficiency of RAPD, ISSR, AFLP and ISTR markers for the detection of

- polymorphisms and genetic relationships in camote de cerro (*Dioscorea* spp.).  
Electron. J. Biotechnol. 17: 65-71.
- Wang X, Felker P, Burow MD, Paterson AH. 1998. Comparison of RAPD marker patterns to morphological and physiological data in the classification of *Opuntia* accessions. J PACD 3.
- Ward, J. H. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function J. Amer. Statist. Assoc., 58:236-244.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES

A pressão de infestação reduziu a produção total de gases em todos os genótipos do gênero *Opuntia*. No gênero *Nopalea* a pressão de infestação influenciou a produção total de gases no IPA-200021. Os dias de infestação pouco alteraram o valor nutricional. As frações de MM, CNF e A+B1 do fracionamento dos carboidratos são alteradas pela interação da palma com a cochonilha do carmim, podendo indicar o impacto dessa interação.

O perfil fitoquímico dos genótipos do gênero *Nopalea* não foi alterado pela pressão de infestação. Já os genótipos do gênero *Opuntia* permaneceram distribuídos em vários grupos evidenciando a mudança do perfil fitoquímico na interação inseto-planta. Os esteroides, saponinas, taninos e flavonoides podem ser utilizados como indicativos de alterações no perfil metabólico em decorrência do nível de infestação, havendo a necessidade de identificar os compostos presentes nestes espectros, principalmente, nos intervalos 0,84 a 1,28 e 3,28 a 4,08 ppm, o quais podem estar relacionados ao comportamento dos insetos.

As interações entre insetos e plantas são complexas e dinâmicas, pois tanto os insetos como as plantas podem apresentar adaptações evolutivas ao longo do tempo. Com a análise do perfil metabólico e a identificação de compostos de interesse na relação inseto-planta é possível inferir os genes e as rotas metabólicas destes compostos, manipulá-los geneticamente, visando aumentar ou diminuir sua produção. Para uma eficiência da manipulação genética, se faz necessário à utilização de outras técnicas como a genômica, proteômica e a transcriptômica, para compreender biologicamente todo o sistema, sobretudo para decifrar as redes de interação inseto-planta e prever biomarcadores.

## **APÊNDICES**

## Apêndice A – Fase do Experimento em campo



Esterco caprino e solo



Pesagem nos vasos



Genótipos utilizados



Seleção e limpeza dos cladódios  
sadios



Exemplares antes do  
desbaste



Exemplares com pedaços de  
cladódios infestados com *D.*  
*opuntiae*



Monitoramento da temperatura e umidade



IPA-20 com doenças secundárias



Genótipos do Gênero *Opuntia* ao final do experimento  
IPA-20, F-08, O.E.M e V-19



Genótipos do Gênero *Nopalea* ao final do experimento  
Miúda, F-21 e IPA-Sertânia



## Apêndice B – Processamento das amostras



Cladódios infestados



Cladódios limpos



Processo de limpeza

## Apêndice C– Análises laboratoriais



Determinação de N e retirada das amostras após 244h de incubação

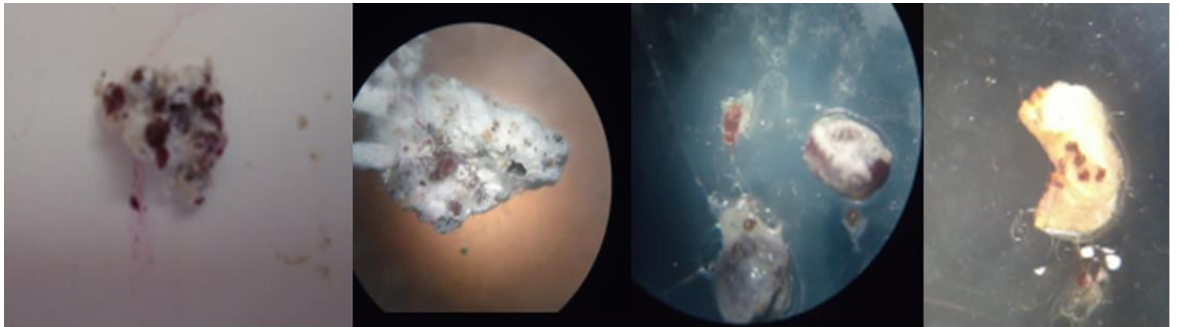


Digestibilidade *in vitro* da MS

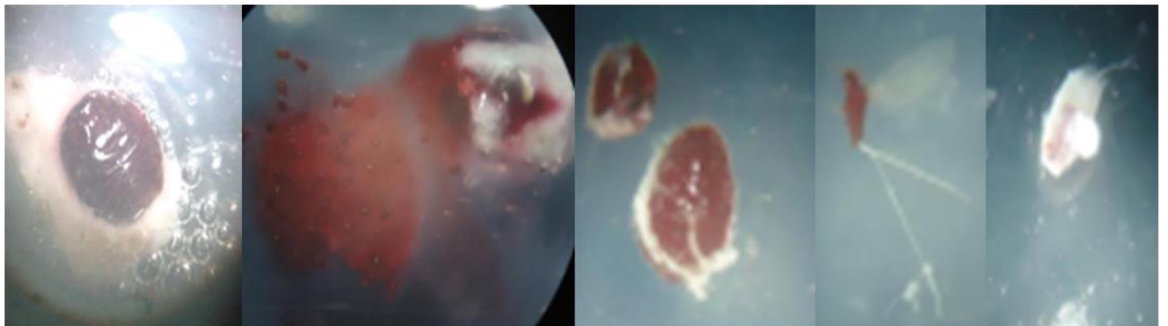


Produção de gases e degradabilidade

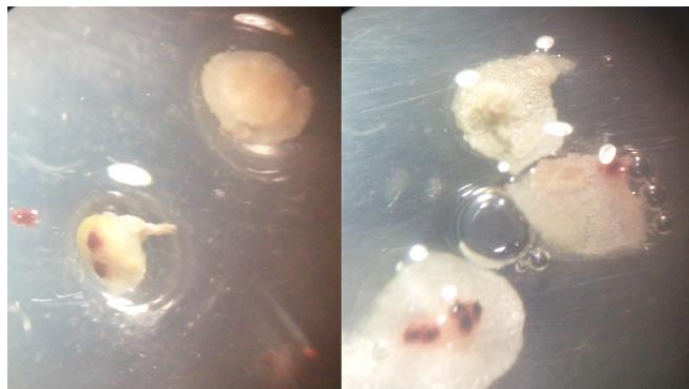
Apêndice D – Colônias de *Dactylopius opuntiae*



Colônia da IPA-20 ao olho nu, colônia da IPA-20 vista na lupa, fêmeas e ninfas, colônia na palma V-19



Fêmea, fêmea grávida e ovos, Fêmea e ninfa II, macho alado, pupa



Colônia na palma V-19